JOURNAL *of* CHROMATOGRAPHY

INTERNATIONAL JOURNAL ON CHROMATOGRAPHY,
ELECTROPHORESIS AND RELATED METHODS

EDITOR:
Michael Lederer (Arcueil, Seine)

EDITORIAL BOARD
P. Boulanger (Lille), G. Duyckaerts (Liège), J. E. Falk (Canberra), A. T. James (London), J. Janak (Brno) K. A. Kraus (Oak Ridge, Tenn.), E. Lederer (Paris), J. F. W. McOmie (Bristol), G. B. Marini-Bettolo (Rome), R. Neher (Basel), F. H. Pollard (Bristol), J. Shankar (Bombay), J. Schubert (Lemont, Ill.), G. M. Schwab (Munich), H. Tuppy (Vienna), P. E. Wenger (Geneva)

VOL. 1 1958

ELSEVIER PUBLISHING COMPANY
AMSTERDAM LONDON NEW YORK PRINCETON

PRINTED IN THE NETHERLANDS BY
DRUKKERIJ MEIJER N.V. WORMERVEER AND AMSTERDAM

rec'd Abstg 4/3/58
RECEIVED
FEB 14 1958
ESSO TECHNICAL LIBRARY

EDITORIAL

The new journal will try to cope with three tasks:

(1) To publish *review articles* on techniques of chromatography etc. and applications to various fields and problems.

(2) To publish *original papers* dealing with chromatographic methods and their applications in analysis and pure chemistry. In the XVth Congress of the International Union of Pure and Applied Chemistry (Lisbon, 1956) which was devoted to Analytical Chemistry, the publications were divided in sections as to the methods used. While every section of analytical chemistry seems to have either an international or national journal specifically devoted to its problems (e.g. *Mikrochimica Acta* for Microchemistry, *Z. für Elektrochemie* for Electrical Methods, *Spektrochimica Acta* for Optical Methods, *J. of Inorg. and Nuclear Chem.* for Radiochemical Methods) no journal dealing with the problems of chromatography and paper electrophoresis etc. seems to exist although the number of contributions in journals and congresses is often greater than that on micromethods or optical methods.
It was thus believed that the existence of a chromatographic journal would be justified especially as many publications in the field no longer fall in the scope of analytical methods but also deal with theoretical questions of structure and constitution.

(3) Chromatography, especially paper chromatography and gas-liquid chromatography have produced a new set of physicochemical constants for the identification of unknown substances (the R_F value and the retention volume). Some modern textbooks on practical organic chemistry already cite these similarly to melting and boiling points.
Many of these data are published in little read journals. It is intended to present collections of these data in each issue of the *Journal of Chromatography*. The subscriber will thus possess in each volume a collection of the more important R_F value tables etc. published during the year.

REVUE D'ENSEMBLE

SÉPARATION D'ISOTOPES PAR CHROMATOGRAPHIE ET PAR ÉLECTROPHORÈSE

MARIUS CHEMLA

Physique et Chimie Nucléaires, Collège de France, Paris (France)

Dès la découverte des isotopes par ASTON, et après les brillants résultats obtenus par HERTZ sur la séparation du ^{20}Ne et du ^{22}Ne, de très nombreuses expériences de séparation d'isotopes ont été réalisées depuis 1920.

Avec le développement de l'industrie nucléaire, la possibilité de séparer des isotopes en quantités importantes, par des moyens économiquement rentables, a acquis un intérêt considérable; c'est ce qui a poussé les divers expérimentateurs à s'intéresser plus particulièrement aux méthodes physico-chimiques. De telles études présentent en outre, du point de vue théorique, l'intérêt de préciser le mécanisme des transformations physico-chimiques par la mesure des effets isotopiques.

La chimie a acquis tout récemment deux nouvelles techniques, la chromatographie et l'électrophorèse, qui ont permis de réaliser très facilement des séparations réputées difficiles, comme les terres rares ou les divers acides aminés. Ces deux techniques ont évidemment été appliquées à la séparation des isotopes. Cet exposé énumère les résultats auxquels elles ont conduit.

Précisons dès maintenant que ces techniques opèrent le plus souvent en milieu liquide; c'est pourquoi elles s'adaptent particulièrement à la séparation des isotopes de certains éléments, certains métaux, qui ne donnent pas de composés gazeux et pour lesquels les techniques de diffusion, distillation, échange chimique ne peuvent pas s'appliquer. Pour ces éléments, la chromatographie et l'électrophorèse apparaissent comme les deux seules techniques utilisables. L'élément le plus important de cette catégorie est le lithium. Les isotopes séparés du lithium trouvent de nombreuses applications dans le domaine de l'énergie atomique. Le ^{6}Li donne lieu, avec une section efficace très élevée, à la réaction nucléaire $^{6}Li(n,\alpha)^{3}H$ et sert à la préparation du tritium. Le ^{7}Li au contraire a une section efficace de capture des neutrons extrêmement faible et peut être utilisé à l'état métallique comme fluide échangeur de température dans les réacteurs produisant de l'énergie.

I. CHROMATOGRAPHIE

Il existe plusieurs mécanismes de chromatographie pour lesquels les processus élémentaires, et par conséquent les efficacités de séparation, sont très différents. Ainsi jusqu'à présent, la chromatographie de partition n'a donné lieu à aucune

Bibliographie p. 22/23.

publication concernant la séparation des isotopes. Quelques séparations ont été réalisées par chromatographie d'adsorption en phase gazeuse. Enfin, en phase uide, seul l'échange d'ions a permis d'obtenir une sèparation isotopique.

Quel que soit le mécanisme de la chromatographie, la séparation est basée sur l'équilibre de répartition de deux ou plusieurs isotopes entre deux phases. A ce point de vue, la colonne à chromatographie présente de nombreuses analogies avec une colonne de distillation fractionnée. C'est pourquoi la lonqueur d'une colonne est souvent exprimée par le nombre de "plateaux théoriques" qu'elle représente. Dans les séparations d'isotopes, ce nombre de plateaux doit être aussi élevé que possible car on n'observe jamais une séparation totale de deux isotopes; mais on obtient seulement des fractions plus ou moins enrichies en l'un ou l'autre des isotopes. C'est pourquoi GLUECKAUF[1] a étudié théoriquement l'influence, sur ce nombre de plateaux théoriques, de différents facteurs: dimensions des grains, volume du liquide interstitiel, vitesse d'écoulement, en relation avec les constantes de diffusion dans les deux phases. Cependant, pour une colonne donnée, il est possible de connaître approximativement le nombre p de plateaux théoriques, à conditon d'admettre un certain nombre d'hypothèses simplificatrices dont les principales sont: (a) l'isotherme d'adsorption est linéaire; (b) la vitesse d'écoulement du liquide est suffisamment faible pour que les deux phases en présence soient constamment en équilibre. Si l'on admet que ces conditions sont remplies, le nombre de plateaux théoriques p peut être calculé, d'après une théorie exposée par MAYER ET TOMPKINS[2], en étudiant la forme de la courbe d'élution d'un élément donné. En général, d'ailleurs ce nombre p varie suivant l'élément qui est étudié.

Chaque mécanisme de chromatographie est caractérisé par son facteur de séparation élémentaire α qui est égal au quotient des rapports des teneurs isotopiques de l'élément dans les deux phases en présence. Si R_1est le rapport isotopique dans la phase liquide, et R_2 est le rapport isotopique dans la phase adsorbée, $\alpha = R_1/R_2$. Ce rapport pourrait être déterminé directement en faisant l'analyse isotopique dans les deux phases lorsque l'équilibre est atteint. Mais la précision serait mauvaise, car la différence des rapports est extrêmement faible. Le facteur α peut être atteint avec plus de précision en suivant la variation du rapport isotopique le long de la bande d'élution à condition de connaître le nombre de plateaux théoriques p, et en appliquant toujours la théorie de MAYER ET TOMPKINS. Cette théorie indique que Log R varie linéairement en fonction du volume élué.

(a) Chromatographie d'échange d'ions

Les travaux les plus anciens dans ce domaine sont ceux de TAYLOR ET UREY[3]. Ces auteurs ont préparé une zéolite artificielle dont la composition est approximativement $Na_2O.Al_2O_3.6SiO_2.xH_2O$, le sodium étant remplaçable par d'autres ions positifs. Si la zéolite sous forme Na est mise en contact avec une solution saline contenant le cation A^+, un équilibre ionique a lieu au bout de quelques minutes:

$$Z\,Na + A^+ \rightleftarrows Z\,A + Na^+$$

Cet équilibre suit approximativement la loi d'action de masse. Pour deux isotopes, les constantes d'équilibre respectives sont légèrement différentes.

Bibliographie p. 22/23.

TAYLOR ET UREY étudient particulièrement la séparation des isotopes du lithium et cherchent à déterminer le facteur de séparation α directement par la méthode des phases en équilibre:

$$\alpha = \frac{^6\text{Li}}{^7\text{Li}\ \text{(zéolite)}} : \frac{^6\text{Li}}{^7\text{Li}\ \text{(solution)}}$$

Mais étant donné la faible différence de comportement des deux isotopes, il est nécessaire de répéter les extractions un grand nombre de fois. La méthode choisie est celle qui consiste à extraire une grande quantité de solution de LiCl par de nombreuses petites quantités successives de zéolite, en sorte que la formule de distillation de RAYLEIGH peut être appliquée:

$$\left(\frac{1 - N_0}{1 - N}\right)^{\frac{1}{\alpha - 1}} \left(\frac{N}{N_0}\right)^{\frac{\alpha}{\alpha - 1}} = \frac{W_0}{W}$$

où N_0 est la fraction d'isotope lourd dans la quantité initiale W_0 de produit et N est la fraction finale dans la quantité W finale.

Pratiquement, une solution contenant 300 g de LiCl a été extraite par un grand nombre de portions successives de 30 g de zéolite de sodium. Quand la quantité de lithium a été réduite d'un facteur 70, le rapport $^7\text{Li}/^6\text{Li}$ qui était initialement égal à 11.6 a atteint la valeur finale 12.7, ce qui donne un facteur de séparation $\alpha = 1.022$. Les analyses isotopiques étaient effectuées par spectrométrie de masse, l'appareil étant celui décrit par BREWER[4].

Plus récemment, GLUECKAUF[1] étudie à nouveau le cas des isotopes de Li afin de vérifier quantitativement les équations déduites de sa théorie permettant le calcul de la hauteur d'un plateau théorique. Il utilise une colonne longue de 90 cm remplie de résine échangeuse d'ions zeo-karb H.I. Le solvant est une solution d'acétate de Li et la séparation des isotopes est étudiée par une méthode de migration de frontière. L'analyse isotopique est effectuée par application de la réaction nucléaire:

$$^6_3\text{Li} + \text{n} \longrightarrow {}^4_2\text{He} + {}^3_1\text{H} + 4.6\ \text{MeV}$$

Pour cela, chaque échantillon évaporé sur un disque de platine est introduit dans une petite chambre d'ionisation contenant une source de neutrons au Ra-Be. Le nombre d'impulsions comptées est proportionnel à la quantité de ^{6}Li présente. Dans ces expériences, GLUECKAUF obtient une fraction de tête dans laquelle la concentration de ^{6}Li est seulement de 0.5% alors qu'elle est de 7.5% dans l'échantillon naturel. Sans interpréter ce résultat en détail, il conclut seulement que le facteur de séparation doit être bien inférieur à celui trouvé par TAYLOR ET UREY.

On peut encore mentionner un travail de GROSSE[5] qui élue une zone de lithium sur une colonne longue de 145 cm remplie d'une résine divinyl styrène sulfonée. La fraction de tête, correspondant à 0.05% du lithium total contient 94.6% de ^{7}Li alors que la fraction de queue correspondant à 0.2% de lithium total contient seulement 89.6% de ^{7}Li. Le travail le plus récent concernant le lithium est celui de MENES, SAÏTO ET ROTH[6]. Les auteurs utilisent une colonne longue de 1 m, remplie de résine Dowex-50. Ils étudient l'élution d'une zone de lithium de 0.4 cm correspondant à

Bibliographie p. 22/23.

150 mg de Li, par une solution d'acide sulfurique 0.3 *N*. La courbe d'élution (Fig. 1) concorde avec celle prévue par la théorie de MAYER ET TOMPKINS, le nombre de plateaux théoriques étant d'environ 4,000. La variation du rapport isotopique le long de la bande d'élution permet de déduire le facteur de séparation α qui a été trouvé compris entre 1.001 et 1.002. Les analyses isotopiques ont été effectuées aussi bien par spectrométrie de masse que par irradiation aux neutrons.

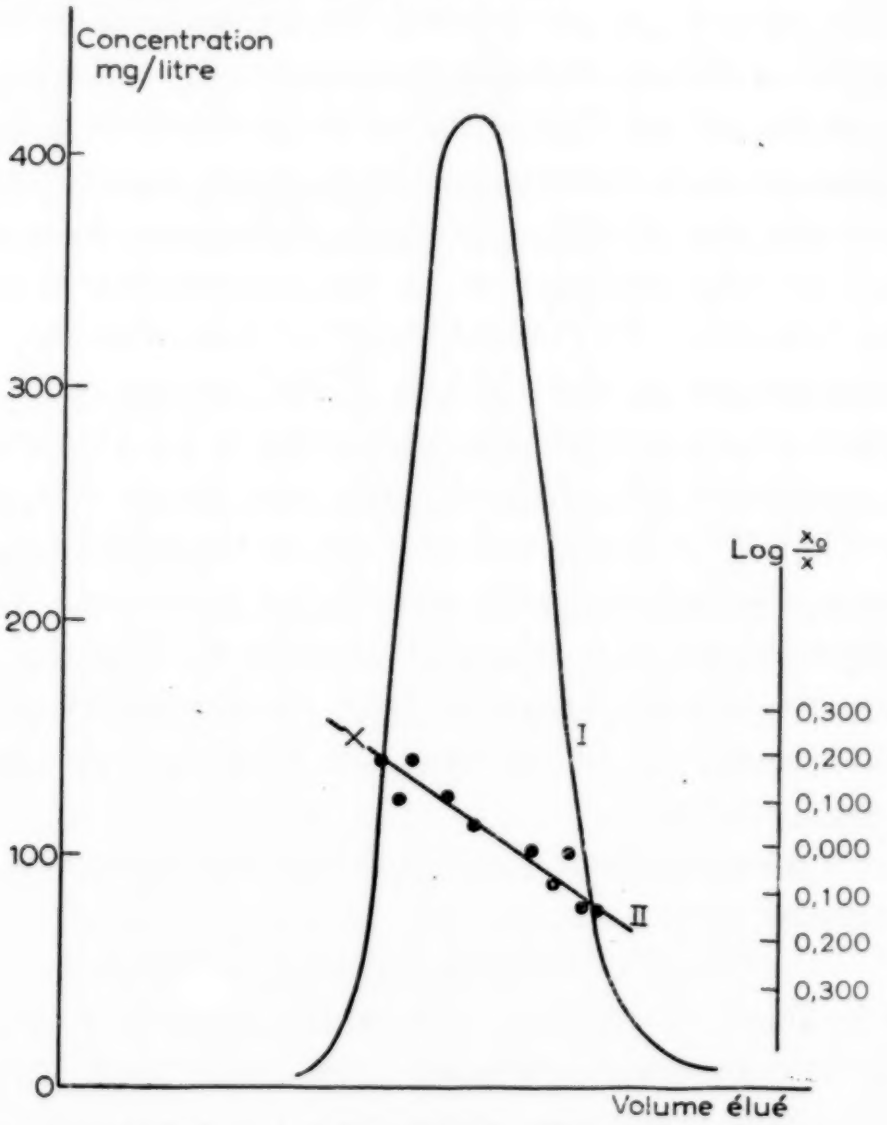


Fig. 1. I: Courbe d'élution de LiCl sur Dowex-50. II: Rapports $^{7}Li/^{6}Li$ exprimés en log x_0/x. (D'après MÉNES, SAITO ET ROTH[6]).

Une technique semblable à cette dernière a été utilisée par BETTS *et al.*[7] pour étudier cette fois la séparation des deux isotopes radioactifs du sodium ^{22}Na et ^{24}Na. Le ^{22}Na est émetteur de rayons β^+ et γ, de période 2.6 ans. Le ^{24}Na émet des rayons β et γ avec une période de 14.8 heures. Ces deux isotopes sont très utiles pour la mesure des effets isotopiques car leur différence relative de masse est élevée ($\Delta M/M = 9\%$); en outre, le rapport $^{22}Na/^{24}Na$ peut être mesuré avec précision en suivant la décroissance de la radioactivité en fonction du temps. En principe, la détermination du rapport isotopique[13] est obtenue par deux mesures d'activité a et a' effectuées à des instant t et t' distants d'environ 48 heures:

$$a = \text{exp.}\,(-\lambda t)^{24}\text{Na} + {}^{22}\text{Na}$$
$$a' = \text{exp.}\,(-\lambda t)^{24}\text{Na} + {}^{22}\text{Na}$$

La résolution de ce système d'équations conduit aux valeurs de ^{22}Na et ^{24}Na ramenées au temps $t = 0$, choisi arbitrairement comme origine.

Bibliographie p. 22/23.

D'une façon générale, l'usage d'isotopes radioactifs est très avantageux, car il est alors facile de mesurer rapidement un grand nombre de rapports isotopiques. En outre, il devient possible de mesurer l'effet isotopique sur des éléments qui ne comportent qu'un seul isotope stable comme le sodium et le césium. Dans les expériences de BETTS *et al.*, l'élution d'une zone d'un mélange de ^{22}Na et ^{24}Na sur une colonne de Dowex-50 de 1 mètre, a permis d'observer des variations de teneur isotopique atteignant au maximum 10% d'une extrémité à l'autre de la zone éluée. Le facteur de séparation déduit est extrêmement faible $\alpha = 1.00016$. Il est intéressant de remarquer que ces auteurs ont observé une diminution très importante de la séparation isotopique lorsque la température de la colonne est élevée; mais ils attribuent cet effet plus à une augmentation des perturbations qu'à une diminution du facteur de séparation.

Les résultats les plus brillants de la chromatographie d'échange d'ions sont ceux obtenus par SPEDDING ET POWELL[8] pour la séparation des isotopes de l'azote. Une bande d'ammoniaque est éluée le long d'une colonne de Dowex-50; cette zone se déplace en conservant des bords très nets grâce à des réactions chimiques ayant lieu à ses deux extrémités. En effet, la résine sous forme NH_4 est éluée par de la soude qui libère NH_4OH; à l'autre extrémité de la bande, l'ammoniaque se combine directement à la résine qui se trouve sous forme hydrogène. La séparation a été effectuée dans plusieurs colonnes disposées en série en sorte que le parcours effectif de la zone d'ammoniaque a été de 200 m. Dans ces conditions, une fraction de queue a été obtenue contenant 74% de ^{15}N alors que le produit de départ était naturel, c'est-à-dire à 0.365% de ^{15}N.

Dans cette dernière expérience, la séparation d'isotopes este commandée par la réaction d'échange chimique:

$$^{15}NH_4R + {}^{14}NH_4OH \rightleftarrows {}^{14}NH_4R + {}^{15}NH_4OH$$

La constante d'équilibre de réaction, c'est-à-dire aussi le facteur de séparation α, est égale à 1.0257. En fait, cette expérience rejoint la méthode classique de séparation d'isotopes par équilibre d'échange isotopique. La séparation de ^{15}N peut être réalisée dans des colonnes à distiller. L'emploi de résine échangeuse d'ions est simplement un moyen commode d'appliquer cette méthode à l'échelle du laboratoire.

D'une façon générale, la séparation d'isotopes par échange d'ions apparaît, du point de vue du principe, comme un cas particulier de la méthode des échanges isotopiques. En effet, lors de la chromatographie, deux réactions d'échange ionique ont lieu:

$$^{6}Li^{+} + Na.Z \rightleftarrows {}^{6}Li.Z + Na^{+}$$
$$^{7}Li^{+} + Na.Z \rightleftarrows {}^{7}Li.Z + Na^{+}$$

La séparation d'isotopes est due au fait que les constantes d'équilibre de ces deux réactions ne sont pas identiques. On en déduit que dans la réaction d'échange:

$$^{7}Li^{+} + {}^{6}Li\ Z \rightleftarrows {}^{6}Li^{+} + {}^{7}Li.Z$$

la constante d'équilibre est légèrement différente de 1.

Théoriquement, il est possible de prévoir la constante d'équilibre de ces échanges isotopiques par l'application de la thermodynamique statistique. Mais actuellement, ces calculs ne sont possibles que dans des cas simples où les molécules en équilibre

Bibliographie p. 22/23.

sont à l'état gazeux. UREY ET GREIF[9] les premiers ont développé une théorie qui permet de prévoir la constante d'équilibre d'un grand nombre d'échanges isotopiques à partir des données des spectres moléculaires. Pour une réaction réversible quelconque:

$$aA + bB = \cdots \rightleftarrows mM + nN + \cdots$$

la constante de la loi d'action de masse $K = P_A^a \cdot P_B^b \,/\, P_M^m \cdot P_N^n$ est égale au rapport des fonctions de distribution f_A des diverses molécules. $K = \dfrac{f_M^{\,m} \cdot f_N^{\,n}}{f_A^{\,a} \cdots f_B^{\,b}}$

Cette fonction de distribution f de chaque molécule est reliée directement à la somme d'état Q qui contient les différents niveaux d'énergie de rotation et de vibration de la molécule: $$Q = \sum_{v,j} p \exp. - \frac{E\,(j,v)}{kT}$$

où $E(j,v)$ est un niveau énergétique caractérisé par les nombres quantiques de rotation et de vibration j et v; et p est le poids statistique de cet état. Ces états énergétiques sont connus à partir du spectre de rotation-vibration des molécules; et par suite la constante K peut être déduite.

Malheureusement le système eau–zéolite est beaucoup trop compliqué et UREY[3] lui-même déclare qu'aucun calcul n'est possible. La possibilité du fractionnement dépend de la différence de liaison des deux isotopes avec l'eau et avec la zéolite. La constante d'équilibre fait intervenir les différences des énergies au point zéro, et des fréquences de rotation et de vibration des deux combinaisons isotopiques. La solvatation des ions ou le type de zéolite jouent un róle important. Tout ce qui peut modifier les liaisons chimiques, la solvatation, modifie aussi le facteur de séparation; mais il est impossible de prédire dans quel sens.

(*b*) *Chromatographie d'adsorption en phase gazeuse*

Dans cette méthode, le gaz est en équilibre avec une phase condensée; il n'y a donc à proprement parler pas de transformation chimique entre les deux phases. A ce titre, le processus du fractionnement est tout à fait identique à celui qui a lieu dans une distillation fractionnée. La possibilité de séparer des isotopes par de telles méthode avait déja été prévue théoriquement par LINDEMANN[10]. La première tentative de séparation d'isotopes par cette technique a été celle de ASTON[11] en 1919, sur le néon. Quoique infructueuse, cette tentative présente un intérêt historique considérable puisqu'elle a conduit à la découverte des isotopes. Le néon avait une masse atomique égale à 20.200 et c'était l'élément le plus léger dont la masse atomique ne fût pas un nombre entier d'une manière indubitable. En 1913, J. J. THOMSON, étudiant les rayons positifs produits dans le néon, découvre à côté de la masse 20 prévue une raie correspondant à la masse 22, qu'il attribue d'abord à une impureté. ASTON alors tente de séparer ces deux gaz de masses 20 et 22, par adsorption fractionnée sur charbon actif refroidi par de l'air liquide. Son appareil est constitué par une succession de tubes remplis de charbon et de tubes vides que le gaz traverse par une série d'ad-

Bibliographie p. 22/23.

sorptions et de désorptions successives. Après une longue et pénible opération correspondant à environ 3000 fractionnements, la densité du néon n'a pas varié à la précision des mesures près (environ 1%). ASTON en conclut que le néon naturel est constitué par un mélange de 2 gaz, l'un de masse 20 et l'autre de masse 22; ces deux gaz sont absolument inséparables par les méthodes habituelles; ce sont des isotopes.

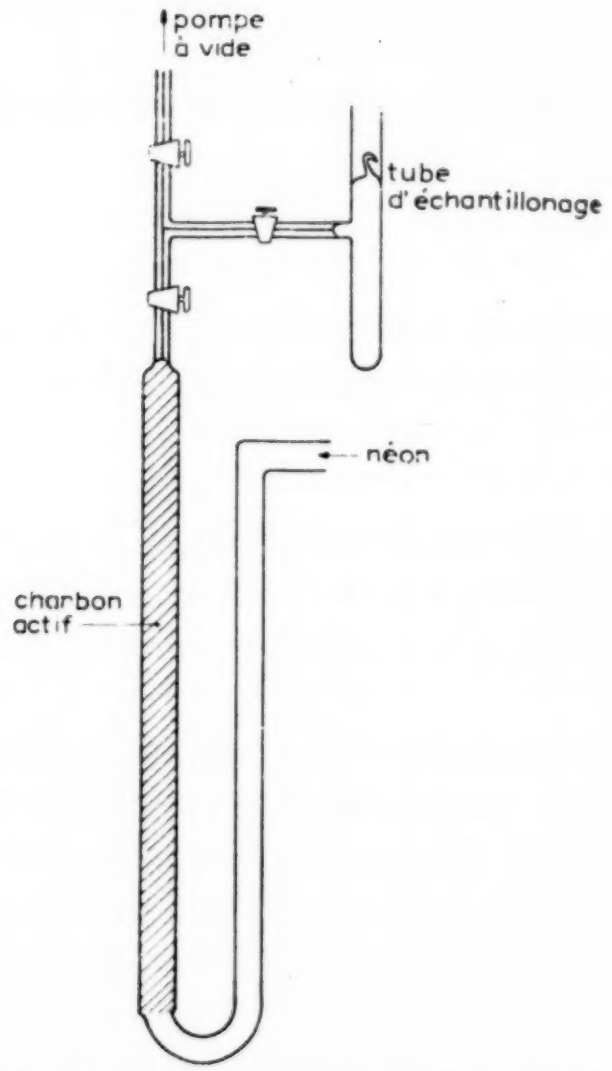


Fig. 2. Chromatographie du néon sur charbon actif.

Les seuls résultats positifs obtenus par adsorption fractionnée sont ceux de GLUECKAUF. Cet auteur étudie[1] en 1949 la séparation des isotopes du néon par chromatographie d'adsorption sur charbon actif, à la température de l'azote liquide. Un tube long de 25 cm et de 0.7 cm de diamètre est rempli de charbon actif et plongé dans un Dewar rempli d'azote liquide. Ce tube est en communication par un capillaire avec une pompe à vide et un dispositif d'échantillonnage en vue de l'analyse par spectrométrie de masse (Fig. 2.) Plusieurs types d'essais sont effectués en variant les conditions expérimentales. Le plus souvent, il s'agit d'une migration de frontière. La fraction de tête présente alors un enrichissement en ^{20}Ne pouvant atteindre 15%.

En appliquant les équations de sa théorie, GLUECKAUF trouve que la hauteur des plateaux théoriques de sa colonne est d'environ 0.2 mm; il en déduit le facteur de séparation $\alpha = 1.002$.

Plus récemment, GLUECKAUF ET KITT[12] ont décrit une méthode de séparation complète des isotopes de l'hydrogène par chromatographie gazeuse. L'adsorbant est une dispersion de noir de Pd dans de l'amiante. Le coefficient d'adsorption décroît quand la masse atomique augmente: $H > D > T$. Le seul gaz qui puisse déplacer H, D ou T du palladium est l'hydrogène lui-même. La méthode employée est une migration de frontière qui permet d'obtenir des fractions de tête contenant les isotopes lourds de l'hydrogène complètement séparés. L'opération a lieu à température ordinaire, mais le facteur de séparation décroît quand la température s'élève.

II. ÉLECTROPHORÈSE

La migration de particules chargées soumises à un champ électrique est un phénomène statistique associé à la diffusion; ce phénomène entre dans le cadre général de la diffusion de particules soumises à un champ extérieur. En effet l'électrophorèse imprime aux ions un mouvement unidirectionnel qui se superpose aux mouvements désordonnés dus à l'agitation thermique. Dans un espace où nous supposerons pour

Bibliographie p. 22/23.

simplifier que les déplacements ne sont possibles que suivant un seul axe, la concentration C des particules varie le long de cet axe et en fonction du temps t suivant l'équation aux dérivées partielles, généralisation de la loi de FICK.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + V\frac{\partial C}{\partial x} \qquad (1)$$

où D est le coefficient de diffusion et V la vitesse imprimée aux particules suivant l'axe des x par le champ électrique, $V = E \cdot v$ où E est le champ électrique et v la mobilité des ions.

Cette équation décrit le mouvement général des particules soumises au champ électrique. Elle admet des intégrales particulières suivant les conditions opératoires; en particulier les intégrales sont différentes suivant qu'il s'agit d'une électromigration de zone ou d'une électromigration en contre-courant. La séparation de deux types de particules est due à la superposition d'une séparation par suite de la différence des coefficients de diffusion, et d'une séparation plus efficace encore due à la différence de mobilité. Ces deux grandeurs v et D varient dans le même sens d'après une formule démontrée par EINSTEIN en 1905 à condition que les mécanismes élémentaires du déplacement des particules soient les mêmes dans les deux cas:

$$\frac{v}{D} = \frac{e}{kT}$$

Pour deux isotopes l'application élémentaire de la théorie cinétique des gaz $D\sqrt{M} = C^{te}$, indique que la différence relative de mobilité est reliée à la différence de masse ΔM par la relation:

$$\frac{\Delta v}{v} = \frac{\Delta D}{D} = \frac{1}{2}\frac{\Delta M}{M}$$

En réalité cette relation n'est valable que dans le cas de gaz parfaits. Les expériences qui vont être décrites montrent que dans les milieux liquides les effets isotopiques sont bien moindres, par suite de l'intéraction des ions avec les particules du milieu environnant (solvatation par exemple).

(*a*) *Electromigration d'une zone de deux isotopes*

Dans le cas d'une zone susceptible de se déplacer librement dans un milieu indéfini, le mouvement des ions se traduit par une translation pure et simple. En effet, si dans l'équation aux dérivées partielles (1) on effectue le changement de variable $X = x - Vt$, cette équation se transforme en une équation de FICK ordinaire:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\frac{\partial^2 C}{\partial X^2}$$

Cela signifie que la répartition finale des ions est tout à fait identique à une répartition due à la diffusion pure, mais que l'ensemble s'est déplacé dans le sens du champ électrique d'une distance $l = Vt$. Mais en réalité l'élargissement de la zone au cours de sa migration n'est pas dû seulement à la diffusion qui est en général très faible; l'élargissement est surtout provoqué par les inhomogénéités du milieu diffusant et du champ électrique.

Dans le cas d'un mélange de deux isotopes, la migration conduit à deux zones

Bibliographie p. 22/23.

distantes l'une de l'autre d'une longueur Δl telle que $\Delta l/l = \Delta v/v$. Remarquons tout de suite que la distance de migration l doit être mesurée par rapport au milieu diffusant; si ce dernier se déplace, par exemple par electroosmose, il faut tenir compte de son déplacement propre. Mais dans les expériences qui vont être décrite l'électroosmose est faible et a été négligée.

Expérimentalement la différence relative de mobilité est obtenue de la façon suivante: Après migration, la zone contenant les 2 isotopes est découpée en une série d'échantillons. Puis dans chaque échantillons, sont déterminées les concentrations C_1 et C_2 des deux isotopes ainsi que la valeur du rapport isotopique. Les courbes de répartition de chacun des deux isotopes peuvent être alors calculées; leurs barycentres sont distants d'une longueur Δl telle que $\Delta l/l = \Delta v/v$, l étant la distance totale parcourue par la zone soumise au champ électrique. L'avantage d'une telle méthode est qu'elle conduit directement à une mesure précise de $\Delta v/v$ sans qu'il soit utile d'interpréter longuement les résultats expérimentaux. Une série d'expériences a été effectuée au Laboratoire de Chimie Nucléaire du Collège de France, dans le but de déterminer la différence relative de mobilité de deux ions isotopes dans des sels à l'état solide, fondu ou en solution aqueuse. Ces mesures permettent de connaître l'effet de masse $\mu = \dfrac{\Delta v/v}{\Delta M/M}$ dans ces divers milieux et d'étudier la variation de μ pour des ions de masse M différente.

(1) *Electromigration dans des monocristaux.* CHEMLA ET SUE[13] ont observé un enrichissement isotopique au cours de la migration du mélange ^{22}Na–^{24}Na dans des monocristaux de NaCl soumis à un champ électrique à température élevée. Les cristaux utilisés ont 12 mm de coté et 3 mm d'épaisseur. Une couche mince de (^{22}Na + ^{24}Na)Cl et déposée par sublimation sur leur surface. Puis chaque cristal, serré entre deux électrodes de graphite, est introduit dans un four électique porté à 750° C et y est soumis pendant 20 heures à une différence de potentiel de 10 volts.

A la fin de l'opération, les cristaux sont découpés en tranches de 0.08 mm au moyen d'un microtome; la radioactivité de chaque échantillon est mesurée; et le rapport ^{22}Na/^{24}Na dans chacun d'eux est déterminé par étude de la décroissance. Ce rapport varie de 1.2 à 1.7 d'une extrémité à l'autre de la zone radioactive. L'interprétation de ce résultat a permis d'évaluer le rapport $\Delta v/v$ trouvé ainsi égal à 4%.

Des résultats analogues ont été obtenus lors de la migration de ^{22}Na ^{24}Na dans des cristaux de KCl et aussi dans une pastille de poudre de KCl comprimée sous 5 t/cm^2. Seulement dans le cas de la pastille, l'enrichissement isotopique est plus faible, sans doute par suite d'une migration intergranulaire.

(2) *Electromigration en solution aqueuse.* Les premières expériences d'électrophorèse sont celles de KENDALL[14] qui tenta de séparer les isotopes du lithium par électromigration dans un gel d'agar. Cette tentative fut infructueuse sans doute parce que le procédé d'analyse isotopique par détermination de la masse atomique était trop peu sensible.

Depuis, l'expérience de KENDALL a été reproduite par ARNIKAR ET CHEMLA[15]. L'électrophorèse a été effectuée dans un tube de verre de 1 cm de diamètre, long de

Bibliographie p. 22/23.

1 m, rempli d'un gel à 2.5% de Bactogar contenant 1% de NH_4NO_3. La zone initiale est constituée par 1 ml de gel contenant 10 mg de $LiNO_3$. Une tension électrique de 150 volts a été appliquée pendant 24 heures. Au bout de ce temps, le gel est extrait de son tube et découpé en échantillons de 5 mm. La zone de lithium déterminée par photométrie de flamme a parcouru 67 cm. Le rapport $^7Li/^6Li$ mesuré au spectromètre de masse varie de 8.8 à 15.2 d'une extrémité à l'autre de la zone. La différence relative de mobilité a été ainsi évaluée à: $\Delta v/v = 0.0036$.

La méthode la plus commode d'étudier l'électromigration en solution est la technique classique de l'électrophorèse sur papier. La première expérience de ce type est la séparation de ^{22}Na–^{24}Na par BONNIN, CHEMLA ET SUE[16]. La différence de mobilité de ^{22}Na et ^{24}Na est très faible, ce qui impose de longues distances de migration. Un dispositif a été conçu permettant de faire parcourir aux ions de longues distances en un temps assez court, de l'ordre de quelques heures. La tension appliquée aux compartiments anodique et cathodique et de 5,000 volts. Pour éviter l'échauffement du papier, celui-ci est immergé dans du tétrachlorure de carbone. Enfin au fur et à mesure de la migration de la zone radioactive, la bande de papier est déplacée en sens inverse, ce qui permet d'effectuer des parcours de plusieurs mètres avec un appareil de dimensions restreintes 40 cm.

La position de la zone radioactive au cours de l'expérience est repérée au moyen d'un compteur Geiger-Müller, Fig. 3.

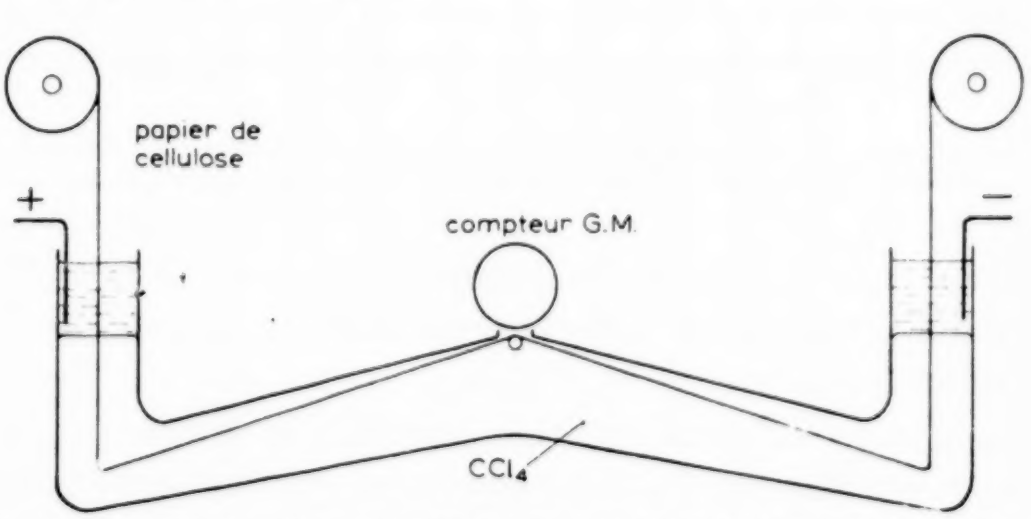


Fig. 3. Électromigration en solution aqueuse sur de longues distances.

Dans une expérience effectuée à température voisine de la température ordinaire, la distance parcourue par la zone radioactive a été de 280 cm en 1 h 45 min. Le rapport isotopique $^{22}Na/^{24}Na$, mesuré par décroissance de la radioactivité, varie de 0.28 à 1.83 d'une extrémité à l'autre de la zone radioactive. Les mesures ont permis de construire les courbes de répartition de ^{22}Na et ^{24}Na individuellement; celles-ci sont distantes d'environ 1 cm (Fig. 4).

Cette expérience permet de calculer la différence relative de mobilité de $^{22}Na^+$ et $^{24}Na^+$ qui a été trouvée égale à $\Delta v/v = 0.003$. Cette valeur est incomparablement plus petite que celle déduite d'une loi en $1/\sqrt{M}$, même en admettant que les ions Na^+ sont hydratés. Un tel résultat se retrouve régulièrement dans les expériences de migration en milieu liquide.

Bibliographie p. 22/23.

L'influence de l'hydratation des ions peut être mise en évidence par l'étude de variation de l'effet isotopique avec la température. BONNIN[17] a construit un appareil de principe analogue à celui de la Fig. 3, mais dans lequel circule du tétrachlorure de carbone maintenu à température constante par un échangeur de température. Cet auteur a pu ainsi observer que la différence relative de mobilité de ^{22}Na et ^{24}Na augmente de façon très notable lorsque la témpérature s'élève variant de 0.003 à

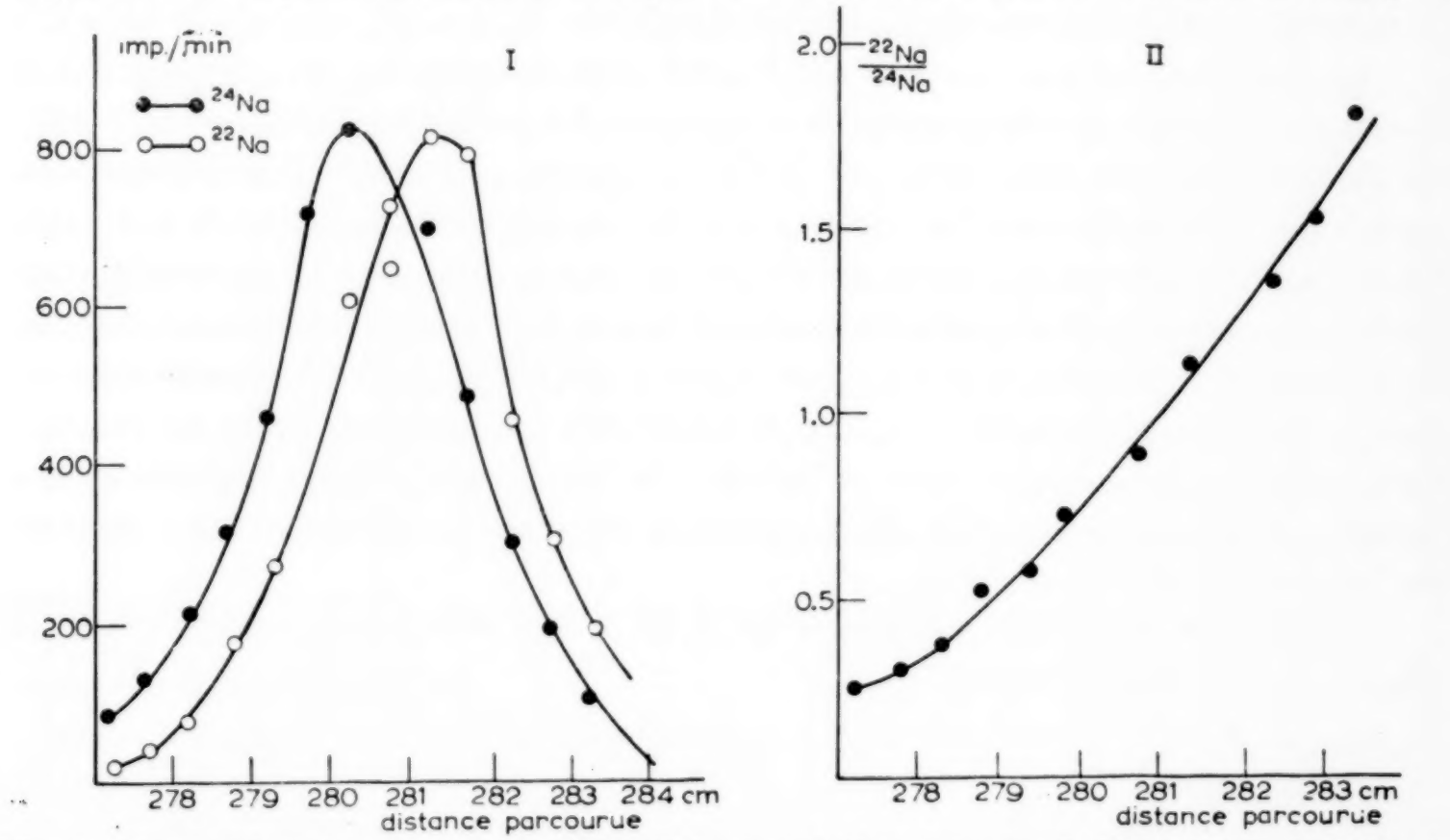


Fig. 4. Electromigration du mélange ^{22}Na–^{24}Na en solution aqueuse. I. Répartition de ^{22}Na et ^{24}Na. II. Rapport $^{22}Na/^{24}Na$ le long de la zone radioactive.

1° C jusqu'à 0.008 à 49° C. Cet effet important montre que la structure de la solution aqueuse se modifie entre 0 et 50° C ou bien que l'hydratation des ions Na^+ diminue lorsque la température s'élève.

L'électromigration sur papier a été appliquée à la séparation des isotopes du lithium par BONNIN ET CHEMLA[18]. L'opération a lieu sur une bande de papier Durieux de 85 × 4 cm, imprégnée d'une solution de NH_4NO_3 à 10%, refroidie par immersion dans du tétrachlorure de carbone. Après électromigration pendant 14 h 30 min. sous 300 V, la zone a parcouru 56 cm. Le rapport isotopique, déterminé par spectrométrie de masse varie de $^7Li/^6Li = 7.6$ en tête de la tache à $^7Li/^6Li = 15.0$ en queue. La courbe de répartition du lithium total déterminée par dilution isotopique au moyen de ^6Li pur a permis de mesurer la différence relative de mobilité de ^6Li et ^7Li trouvée égale à $\Delta v/v = 0.0038$.

(3) *Electromigration dans des sels fondus.* La méthode d'électromigration d'une zone a pu être étendue aux sels fondus. Pour cela un support poreux est nécessaire pour éviter les courants de convection. Parmi les matériaux utilisables, le papier d'amiante s'est avéré le plus avantageux, car la méthode devient tout à fait semblable à une classique électrophorèse sur papier de cellulose. Elle parait plus compliquée que cette dernière car elle nécessite une température élevée; par contre, elle permet

Bibliographie p. 22/23.

de faire passer sans inconvénient un courant électrique beaucoup plus intense et de traiter ainsi des quantités de matière environ 10 fois plus importantes.

L'électrophorèse est effectuée sur des bandes de papier d'amiante longues de 62 cm, larges de 12 mm et épaisses de 0.3 mm, imprégnées de nitrates alcalins fondus. La zone initale est constituée par environ 20 mg du sel étudié. L'opération a lieu dans un four horizontal constitué par un tube de pyrex chauffé électriquement à 350° C (Fig. 5).

En général la tension appliquée est de 600 volts, le courant de 200 mA. Dans

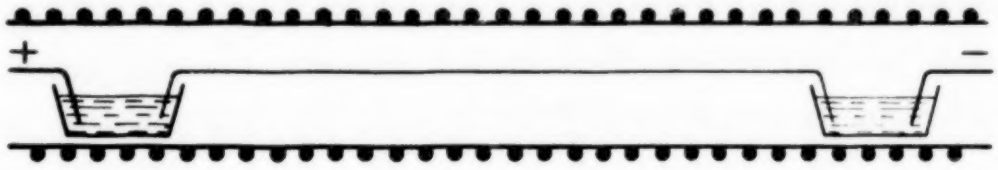


Fig. 5. Électromigration sur papier d'amiante imprégné de sels fondus.

ces conditions, la distance parcourue par les ions atteint une trentaine de centimètres en 2 ou 3 heures.

Cette méthode a été appliquée tout d'abord par CHEMLA ET BONNIN[19] à la séparation ^{22}Na–^{24}Na. Avec un champ électrique de 14 V/cm, la zone de $^{22}Na + ^{24}Na$ a parcouru 35 cm en 4 heures. Le rapport isotopique varie de 0.6 à 1.8 d'une extrémité à l'autre de la zone radioactive. La différence relative de mobilité a été trouvée égale à $\Delta v/v = 0.01$ (Fig. 6).

Ensuite CHEMLA[20] a pu étudier très facilement la séparation des isotopes du lithium, puisque l'électrophorèse dans les sels fondus permet de traiter des quantités

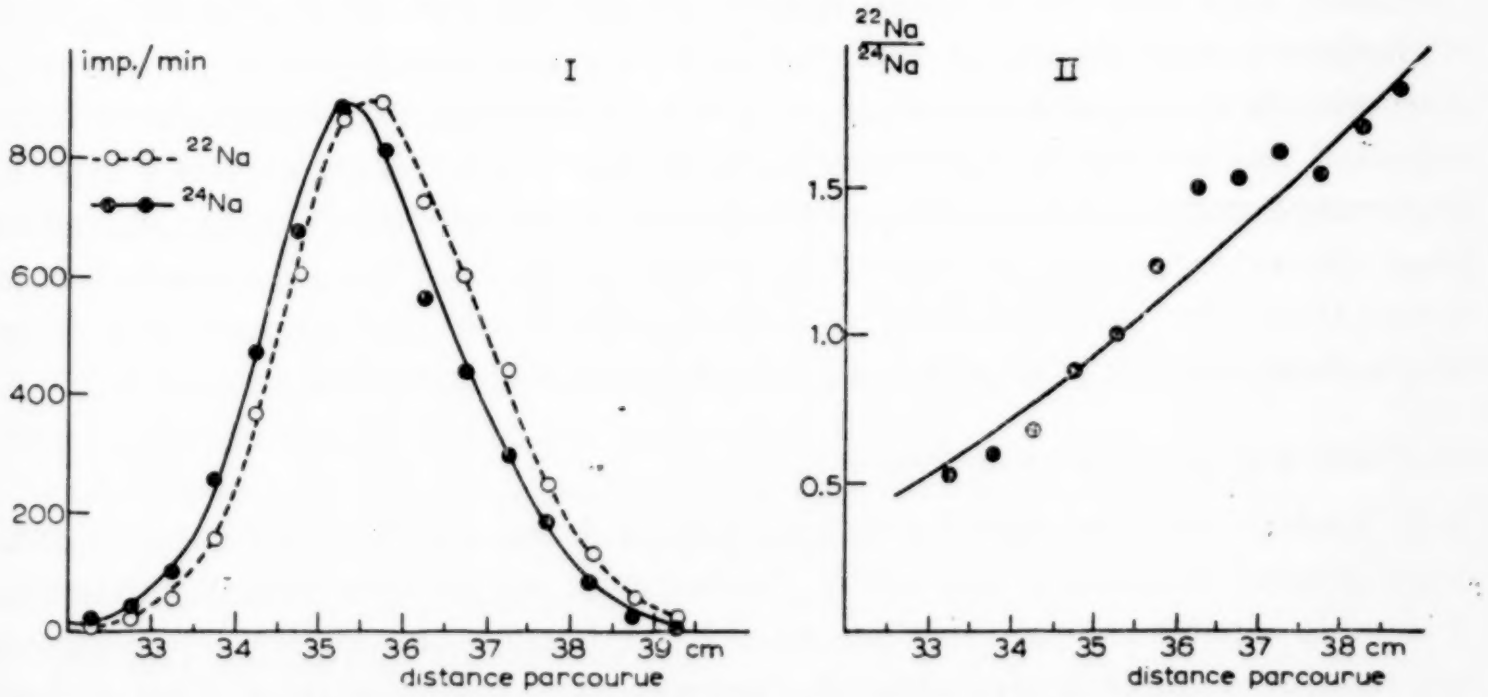


Fig. 6. Électromigration du mélange ^{22}Na–^{24}Na dans $NaNO_3$. I. Répartition de ^{22}Na et ^{24}Na II. Rapport $^{22}Na/^{24}Na$ le long de la zone radioactive.

appréciables de matière. La zone initiale est constituée par un dépôt de 30 mg de $LiNO_3$ pur. Après un parcours de 31 cm, la zone de lithium est déterminée par photométrie de flamme; le rapport $^{7}Li/^{6}Li$ varie de 6.8 en avant de la zone à 14.7 en arrière. La différence relative de mobilité des deux isotopes ^{7}Li et ^{6}Li trouvée égale à $\Delta v/v = 0.014$ à 350° C.

Bibliographie p. 22/23.

La même technique a été utilisée par MANGALO, ARNIKAR ET CHEMLA[22] pour étudier la séparation des isotopes du rubidium ^{85}Rb et ^{87}Rb. La répartition de la zone finale est déterminée par l'emploi de l'indicateur radioactif ^{86}Rb. Le rapport $^{85}Rb/^{87}Rb$, mesuré au spectromètre de masse a pour valeurs extrêmes 3.00 en avant de la zone et 2.40 en arrière. La différence de mobilité de ces deux isotopes a été trouvée égale à 0.00117.

Enfin ARNIKAR ET CHEMLA[15] ont appliqué cette technique à la séparation des deux isotopes radioactifs $^{131}Cs - ^{137}Cs$. La mesure du rapport isotopique est obtenue par analyse des rayonnements émis, au moyen d'un écran absorbant. Après un parcours de 41 cm, le rapport $^{131}Cs/^{137}Cs$ aux deux extrémités de la zone radioactive prend les valeurs 0.59 en avant et 0.35 en queue. La différence de mobilité est de $\Delta v/v = 0.0027$.

Les résultats obtenus par électromigration dans $NaNO_3$ fondu sont résumés dans le Tableau I.

TABLEAU I

Isotopes	$\Delta v/v$	$\mu = \Delta v/v : \Delta M/M$
^{6}Li–^{7}Li	0.014	0.089
^{22}Na–^{24}Na	0.010	0.10
^{85}Rb–^{87}Rb	0.0016	0.069
^{131}Cs–^{137}Cs	0.0027	0.06

Ces résultats montrent que $\Delta v/v$ ne dépend pas seulement de la différence relative de masse, mais aussi de la masse absolue des isotopes considérés. Il serait possible d'interpréter qualitativement cette variation par une théorie cinétique qui ferait intervenir la remarque suivante: Dans le champ électrique, les ions les plus légers subissent une accélération plus grande, mais par contre, dans les chocs avec les particules du solvant des ions les plus lourds sont moins ralentis. Ce mécanisme aurait pour effet de rapprocher les vitesses de migration des deux isotopes. Cependant les interactions entre particules dans un milieu condensé sont mal connues, et le mécanisme élémentaire de la migration est certainement très complexe.

(*b*) *Electromigration en contre-courant*

Si la méthode d'électromigration de zone permet de mesurer très facilement la différence relative de mobilité, par contre elle ne paraît pas rentable pour la production d'isotopes séparés en quantités notables. Il est possible de préciser les conditions qui rendent rentable la séparation des isotopes par électromigration. Tout d'abord le parcours du mélange d'isotopes doit être le plus long possible. Mais pour diminuer la consommation d'énergie, le champ électrique doit être appliqué seulement entre les extrémités de la zone des deux isotopes; les électrodes doivent donc suivre cette zone au fur et à mesure de son déplacement. Ces conditions sont réalisées dans les appareils d'électromigration à contre-courant. Dans ces dispositifs, le liquide soumis au champ électrique se déplace avec une vitesse égale à la vitesse de migration des ions à séparer mais en sens inverse; en sorte que la vitesse nette de ces ions est nulle.

Bibliographie p. 22/23.

Cette technique permet ainsi de faire parcourir au mélange d'isotopes des distances effectives très longues dans des appareils de dimensions modestes. Ce principe a donné lieu a des réalisations extrêmement intéressantes aux U.S.A. et en Allemagne. Les premières utilisent les sels en solution aqueuse; les dernières opèrent sur des sels fondus.

(1) *Electromigration en contre-courant dans des solutions aqueuse.* Cette technique de séparation d'isotopes avait été mise au point dès 1941 mais avait été tenue secrète à cause des hostilités. C'est en 1946 qu'apparaît la première publication de BREWER, MADORSKY ET WESTHAVER[22] concernant la séparation des isotopes du potassium. Puis, dans une publication suivante, BREWER, MADORSKY *et al.*[23] décrivent en détail la mise au point de leur méthode. Le principe du contre-courant est le suivant: considérons un tube en U, rempli de sable en son milieu, et contenant une solution de K_2SO_4. Une différence de potentiel est appliquée entre les 2 extrémites du tube; les ions K^+ migrent vers la cathode, et les ions SO_4^{--} vers l'anode. Un reflux total peut être assuré en ajoutant de l'acide sulfurique au compartiment cathodique en quantité telle que le pH reste neutre, et à une concentration telle que la solution cathodique ne change pas de titre. Dans ces conditions l'électrolyte s'écoule dans le diaphragme poreux avec un débit qui compense exactement la vitesse de migration des ions K^+. Comme les ions $^{39}K^+$ ont une mobilité légèrement supérieure à celle de ^{41}K, ils pourront remonter le courant tandis que les ions ^{41}K seront entraînés vers le compartiment anodique. Ainsi le compartiment anodique s'enrichit en ^{41}K. Le compartiment cathodique est alimenté constamment en KOH afin de compenser la formation de H_2SO_4; sa composition isotopique ne varie donc pas.

De telles expériences peuvent aussi être utilisées en vue de déterminer la différence de mobilité de deux isotopes à partir des enrichissements isotopiques observés.

Si C_1 et C_2 sont les concentrations des isotopes ^{39}K et ^{41}K dont les mobilités sont μ_1 et μ_2, le flux des ions à travers la surface réelle A de la section de tube est:

$$AC_1\left(\mu_1\frac{P}{l}-v\right)\text{ ions }^{39}\text{K, et }AC_2\left(\mu_2\frac{P}{l}-v\right)\text{ ions }^{41}\text{K}$$

où P est la différence de potentiel appliquée, l la longueur de diaphragme et v la vitesse d'écoulement du liquide en cm/sec.

La vitesse v est ajustée de façon que le flux net en ion K^+ est nul,

$$v=\frac{P}{l}\frac{C_1\mu_1+C_2\mu_2}{C_1+C_2}$$

En sorte que le flux des ions est égal

$$\pm A\frac{P}{l}C_1C_2\frac{\mu_1-\mu_2}{C_1+C_2}$$

Le signe est positif ou négatif suivant qu'il s'agit d'un isotope ou de l'autre.

En sorte que l'évolution de la composition isotopique du compartiment cathodique en fonction de temps est

$$\frac{\mathrm{d}}{\mathrm{d}t}\log\frac{C_1}{C_2}=\frac{AP}{V_cl}(\mu_1-\mu_2)$$

où V_c est le volume cathodique.

Bibliographie p. 22/23.

Le succès de la séparation des isotopes dépend de la qualité du remplissage constituant le diaphragme, de la nature de l'électrolyte et surtout de la précision du dispositif qui àssure l'équilibre exact entre la vitesse de migration des ions et celle de l'écoulement du liquide.

L'appareil adopté pour ces expériences est représenté schématiquement sur la Fig. 7.

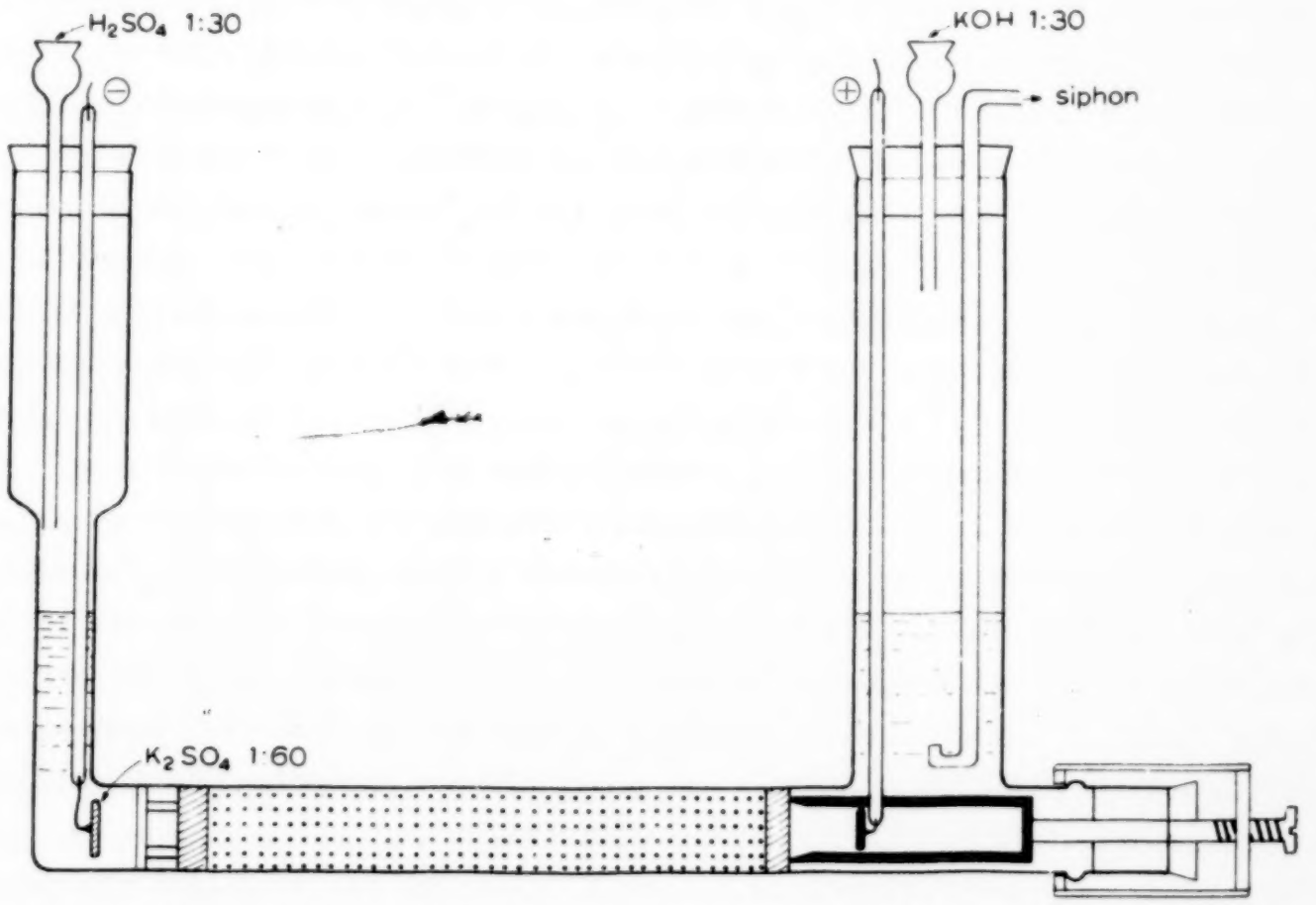


Fig. 7. Appareil de BREWER ET MADORSKY pour la séparation de ^{41}K par électromigration en contrecourant.

Après une étude systématique de tous les facteurs qui peuvent influencer la séparation, BREWER ET MADORSKY, trouvent que l'efficacité de la séparation, est pratiquement indépendante des dimensions du tube de séparation, de la nature du remplissage, de l'anion combiné au potassium, du courant d'électrolyse et de la température. La principale source de difficultés est la non-uniformité du milieu poreux, qui peut donner lieu à la formation de chemins préférentiels; cette non-uniformité pouvant être provoquée par un dégagement de bulles d'air dans la masse du remplissage. Parmi les matériaux utilisables pour constituer le diaphragme, un remplissage de sable fin (mesh 100) s'est avéré bien supérieur à ceux constitués de verre fritté, de laine de verre, d'amiante ou de tubes de capillaire.

Avec un appareil du type de la Fig. 7, le tube de séparation rempli de sable fin ayant 10 cm de long et 1.4 cm de diamètre, une expérience de séparation d'isotopes du potassium est conduite de la façon suivante: le tube est rempli d'une solution de KCl de concentration $KCl/H_2O = 1/60$; le compartiment cathodique est alimenté d'une solution de HCl à 1/30 qui maintient le pH neutre; le compartiment anodique reçoit une solution de KOH à 1/30. L'appareil est plongé dans un thermostat. Le courant est de l'ordre 0.5 Amp sous une tension de 93 volts. Le volume cathodique

Bibliographie p. 22/23.

est de 11 cm³. Périodiquement la composition isotopique de ce compartiment est mesurée au spectromètre de masse (Tableau II). Les auteurs en déduisent que la différence relative de mobilité a ^{39}K et ^{41}K et voisine de 0.0022.

TABLEAU II

Heures	$^{39}K/^{41}K$
0	14.20 (K naturel)
41	15.30
131	16.4
209	19.2
377	22.2
449	24.0

L'appareil décrit Fig. 7 ne peut servir qu'à la production de fractions enrichies en isotope léger. Une légère modification permet d'obtenir aussi un enrichissement en ^{41}K. Pour cela le compartiment anodique est rempli de LiCl, tandis que le tube de séparation est rempli de KCl; la frontière entre les deux solutions est nette; elle est maintenue stable tout au long de l'expérience. Cette frontière devient extrêmement fine lorsque le champ électrique est appliqué en raison de la mobilité plus faible de l'ion Li^+. Le compartiment anodique est alimenté alors continuellement en LiCl pour éliminer les produits de l'électrolyse. Par cette méthode le rapport $^{39}K/^{41}K$ a pu être abaissé à 9.1.

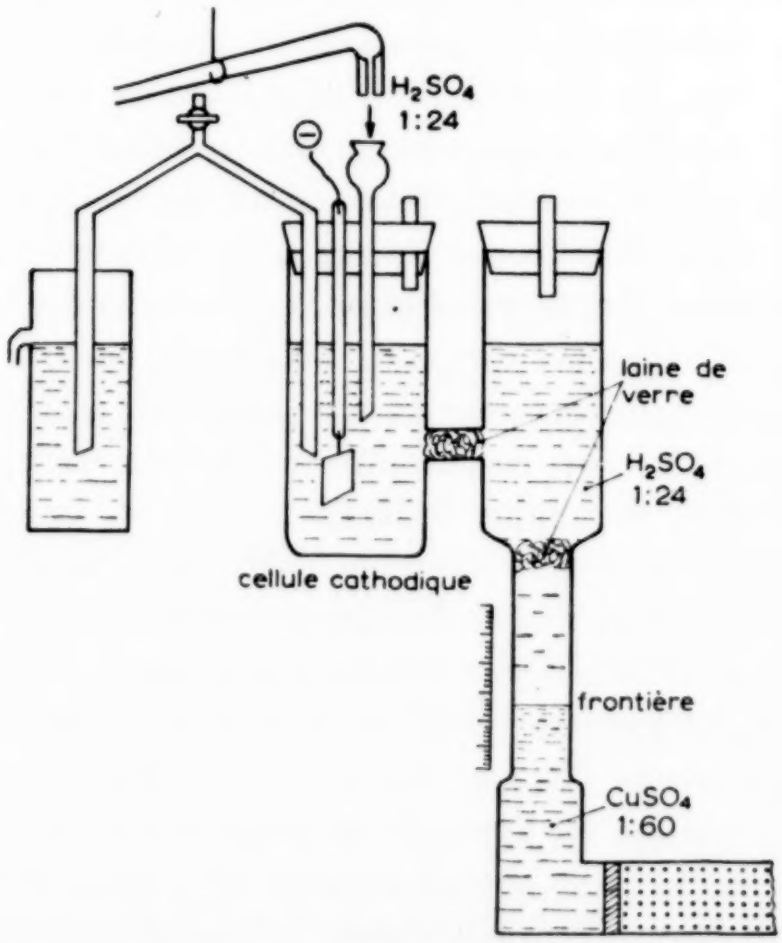


Fig. 8. Dispositif utilisé pour concentrer ^{63}Cu. La frontière entre $CuSO_4$ et H_2SO_4 évite le dépot de cuivre à la cathode.

Le dispositif précédent peut aussi bien être utilisé à séparation d'isotopes en utilisant la migration des anions. MADORSKY ET STRAUS[24] séparent ainsi les isotopes

de chlore. Des variations du rapport $^{35}Cl/^{37}Cl$, atteignant 30% ont pu être ainsi obtenues. L'usage des frontières séparant le tube des compartiments d'électrodes permet d'éviter les transformations chimiques qui risqueraient de perturber l'opération. Ainsi, pour la séparation des isotopes du cuivre, MADORSKY ET STRAUS[25] maintiennent au voisinage du compartiment cathodique une frontière nette entre la solution de $CuSO_4$ et une solution de H_2SO_4 (Fig. 8). Les enrichissements isotopiques obtenus atteignent à peine 1 à 2%. La différence de mobilité de ^{63}Cu et ^{65}Cu paraît extrêmement faible. De même l'usage des frontières a été appliqué à la séparation des isotopes de l'uranium en utilisant comme électrolyte $UO_2(NO_3)_2$. Un enrichissement de 2.8% en ^{235}U a été ainsi observé. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'un brevet d'invention[26]. Signalons pour finir un travail de RAMIREZ[27] qui obtient de légers enrichissements isotopiques sur le rubidium, par électromigration en contre courant, dans un dispositif semblable à celui de BREWER ET MADORSKY. La colonne à remplissage est remplacée par un empilement sérré de membranes semi-perméables. Dans sa publication cet auteur déclare avoir observé un léger effet de température qu'il attribue à une variation de l'hydratation des ions.

(2) *Electromigration en contre-courant dans des sels fondus.* Vers 1944, KLEMM[28], en Allemagne, suggéra que la séparation d'isotopes par électromigration serait plus efficace en milieu "sec"; car dans les solutions les phénomènes de solvation diminuent la différence relative de masse des ions isotopes. C'est pourquoi il commença par utiliser des sels solides. Ainsi au cours d'une électrolyse prolongée d'un barreau solide de α-AgI, à 230° C, la frontière entre l'anode de graphite et AgI solide s'enrichit progressivement en ^{109}Ag. La concentration de cet isotope est passée de 48 à 51%[29].

Puis en 1947, KLEMM[30] se tourne vers les sels fondus et met au point sa méthode d'électromigration en contre courant qui lui permet d'obtenir d'importants enrichissements isotopiques sur le lithium. Sur la Fig. 9 est représenté schématiquement un dispositif particulièrement simple utilisé pour la séparation des isotopes du lithium[31]. L'appareil est en verre Supremax rempli de LiCl fondu porté à 650° C. La partie en U est le tube de séparation, de diamètre 5.6 mm, rempli de poudre de quartz en grains de 0.13 mm. Les électrodes sont en graphite; le courant électrique est de 0.5 Amp. Par suite de l'électrolyse, du chlore se dégage à l'anode; tandis qu'à la cathode le lithium métallique qui se dépose est immédiatement transformé en LiCl par un courant de chlore. Cette recombinaison assure le contre-courant. C'est là un avantage de l'emploi des sels fondus: le tube contenant constamment du LiCl pur, les conditions de "reflux" total sont toujours remplies; un réglage de la pression de N_2 sur le compartiment cathodique assure l'égalité des niveaux de liquide de part et d'autre du tube de séparation. Avec un tel appareil, un gramme de LiCl dont la teneur en ^6Li est passée de 7.3 à 16.1% a été obtenu au bout de 4 jours de fonctionnement.

La théorie du processus d'enrichissement isotopique par cette méthode présente évidemment des analogies avec celles de BREWER ET MADORSKY. KLEMM[32] a traité théoriquement le cas général de la séparation d'un mélange binaire dans le cas d'une colonne de longueur infinie. Un calcul laborieux lui permet de construire un graphique donnant la valeur du facteur de séparation, en fonction de la différence de mobilité

Bibliographie p. 22/23.

des deux isotopes et du temps, pour différentes compositions du mélange. Il observe alors que, pour une durée d'électrolyse donnée, le facteur de séparation dépend de la proportion de l'isotope étudié: plus l'isotope est rare et plus il est difficile de le concentrer d'un facteur donné. Dans le cas d'une colonne de longueur finie, l'enrichissement isotopique atteint une valeur limite d'équilibre.

Dans un calcul simplifié, KLEMM[33] déduit une équation pratique qui lui permet de calculer la différence de mobilité de deux isotopes à partir des analyses de compo-

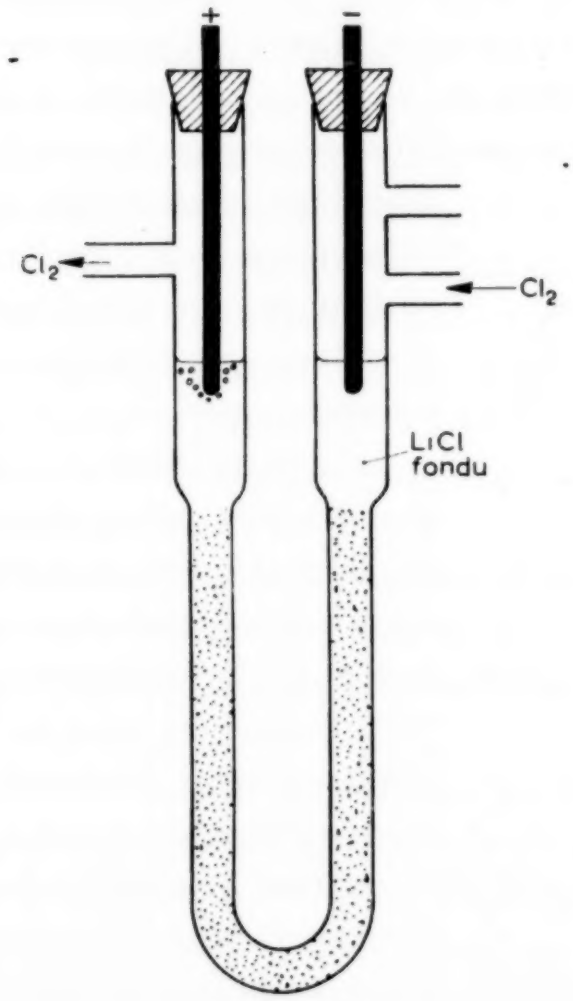


Fig. 9. Dispositif utilisé par KLEMM pour la séparation des isotopes du lithium. Du chlore est envoyé à la cathode pour empêcher le dépot de lithium métallique.

sitions isotopiques et de la quantité d'électricité qui a traversé le tube. Il considère un volume de liquide constitué par le compartiment cathodique et une partie du tube de séparation telle que la surface limite est à la même composition isotopique que le produit initial. Soit W_i la vitesse du cation i, par rapport à celle des ions Cl, W^0 la vitesse moyenne des ions. Si N_i est la concentration de l'isotope, le flux à travers la surface S est:

$$\frac{dN_i}{dt} = Sn_i (W_i - W^0)$$

où N_i est le nombre total d'atomes de l'isotope i dans le volume considéré.

En fonction du temps, N_i est donc égal à:

$$N_i = N^0_i - Sn^0_i (W_i - W^0) t$$

D'autre part la charge électrique transportée par les cations à travers la même surface S est: $Q = S.F.n^0 . W^0 t$, où F est le Faraday.

Bibliographie p. 22/23.

Ces deux équations donnent:

$$\frac{W_i - W^0}{W^0} = \frac{N_i^0 - N_i}{N_i^0} \cdot \frac{FN^0}{Q}$$

Maintenant si l'on écrit ces équations pour deux isotopes i et j, on en déduit:

$$\frac{W_i - W_j}{W^0} = -\left(\frac{N_i}{N_i^0} - \frac{N_j}{N_j^0}\right)\frac{FN^0}{Q}$$

Cette équation permet de déduire la différence relative de mobilité $\frac{W_i - W_j}{W^0}$ des deux isotopes. Tout récemment KLEMM ET MONSE[34] ont généralisé cette technique pour la mesure des mobilités de divers ions dans un mélange de sels fondus. Ces mobilités peuvent être mesurées directement par observation de frontières migrantes. Mais elles peuvent être aussi déduites de l'analyse chimique et isotopique des réservoirs anodique et cathodique: Un calcul analogue à celui qui précède s'applique à un mélange quelconque d'ions différents ou isotopiques.

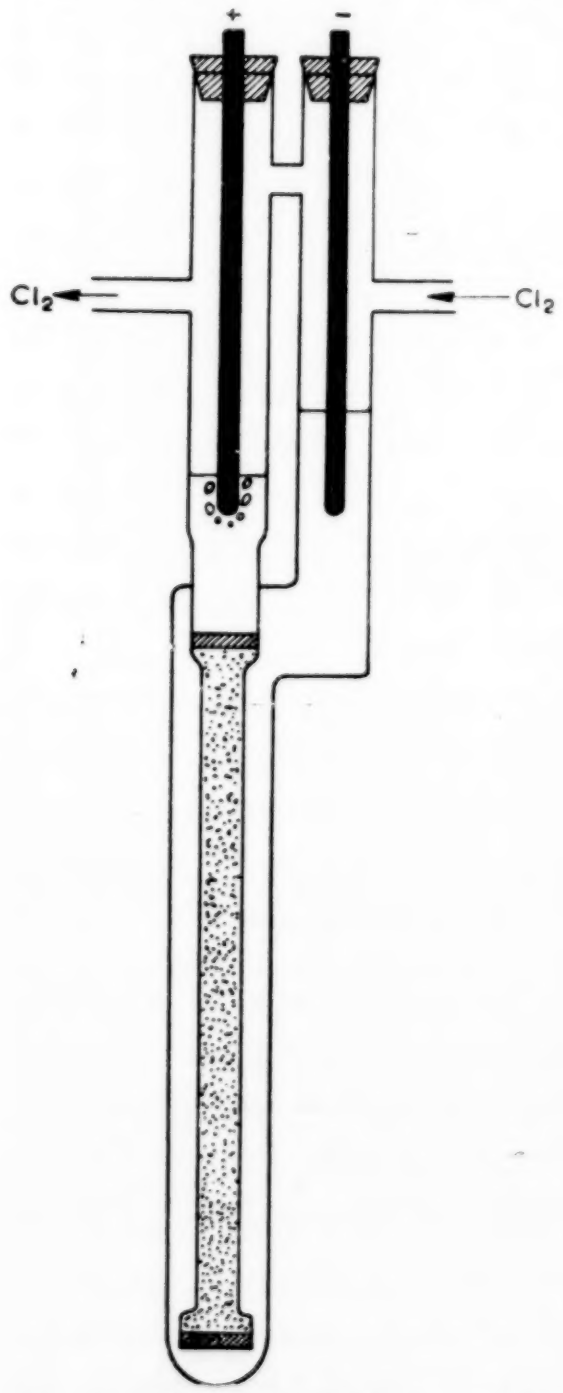


Fig. 10. Électromigration en contre-courant dans des halogénures métalliques fondus.

La méthode de KLEMM a été utilisée dans un grand nombre d'expériences, pour la détermination des différences des mobilités d'isotopes dans des sels fondus. L'appareil employé alors est représenté dans la Fig. 10. La colonne de séparation est rectiligne, en verre Supremax, remplie de poudre de verre maintenue par deux disques de verre fritté. Cette colonne sépare le réservoir anodique du réservoir cathodique. L'appareil s'introduit dans un four vertical porté à la température convenable. En particulier cette technique s'adapte très aisément à la séparation des isotopes des halogènes. Ainsi pour séparer les isotopes du chlore KLEMM ET LUNDEN[35] utilisent comme électrolyte du chlorure de plomb fondu. L'anode est en plomb, et se dissout au cours de l'électrolyse en reconstituant continuellement du $PbCl_2$. Le "reflux total" est donc assuré constamment. Par cette méthode, la concentration de ^{35}Cl a pu être doublée dans le compartiment anodique après une électrolyse durant 7 jours. La différence de mobilité de ^{35}Cl et ^{37}Cl est trouvée égale à 0.29%. Dans cette technique l'électrolyte peut être aussi du $ZnCl_2$; dans ce cas l'anode est en zinc[36]. De même, pour séparer les isotopes du brome, l'électrolyte utilisé est le bromure de plomb[37].

Dans la séparation des isotopes d'éléments électropositifs, le reflux est assuré par une recombinaison constante du métal qui se dépose à la cathode. Le plus souvent l'électrolyte est un chlorure métallique, et la recombinaison est produite par un

Bibliographie p. 22/23.

barbotage de Cl_2 dans le compartiment cathodique. Cette technique a été utilisée pour la séparation des isotopes du lithium[31], la recombinaison des métaux alcalins étant très aisée. Pour les autres métaux il est avantageux de former une "frontière" avec un second sel entre le tube de séparation et le compartiment cathodique. Par exemple KLEMM, HINTENBERGER ET LUNDEN[38] séparent les isotopes du zinc en électrolysant du $ZnCl_2$ fondu, le dépôt de zinc étant évité par une réserve de $PbCl_2$ placée entre le tube de séparation et la cathode. Ainsi l'électrolyse ne dépose à la cathode que du plomb métallique. La frontière entre les deux sels $ZnCl_2$ et $PbCl_2$ reste nette pendant toute l'opération. Cette dernière technique est encore améliorée par l'usage d'une réserve de LiCl dans le compartiment cathodique; ainsi le Li qui se dépose dans la cathode est constamment recyclé sous forme de LiCl par un barbotage de Cl_2 au voisinage de la cathode. Le cation Li^+ étant très mobile, la frontière entre le LiCl et un second chlorure demeure nette au cours d'une électrolyse même prolongée. Par cette méthode, FLOBERG, KLEMM ET LANG[39] ont obtenu une séparation partielle des isotopes de l'argent, en faisant passer une courant continu de 300 mA, dans la chaîne: charbon anodique | AgCl fondu | LiCl fondu | charbon cathodique + Cl_2. Au bout de 50 heures, les rapports $^{107}Ag/^{109}Ag$ aux extrémités du tube de séparation différaient d'environ 10%.

La méthode devient alors applicable à d'autres éléments, et a ainsi permis une séparation partielle des isotopes du cuivre[40], puis de ceux du plomb[41], par électrolyse prolongée du chlorure correspondant avec une cathode de LiCl constamment renouvelé.

L'influence de la nature de l'anion a été étudiée par LUNDEN. Cet auteur trouve que la séparation des isotopes du lithium est plus efficace par l'emploi de LiBr fondu La différence relative de mobilité de ^6Li et ^7Li est environ deux fois plus grande dans LiBr que dans LiCl.

Les halogénures métalliques ont généralement un point de fusion élevé ce qui rend difficile le choix des matériaux utilisables pour la construction des tubes de séparation. C'est pourquoi LUNDEN a tenté d'appliquer la technique d'électromigration en contre-courant aux nitrates fondus. Mais il devient alors difficile d'assurer la recombinaison des oxydes métalliques qui se déposent à la cathode. Une recombinaison seulement partielle est obtenue au moyen d'un barbotage de $NO_2 + O_2$. Ces expériences ont permis d'observer une légère séparation des isotopes de K [43] et de Li [44].

Les expériences qui précèdent ont permis, en outre, de mesurer la différence relative de mobilité $\Delta v/v$ d'ions isotopes d'éléments divers. Pour que les résultats numériques soient comparables entre eux, il est préférable d'introduire l'effet de masse,

$$\mu = \frac{\Delta v}{v} \Big/ \frac{\Delta M}{M}$$

grandeur qui est indépendante de la différence relative de masse $\Delta M/M$. Les résultats des mesures sont rassemblés dans les Tableaux III et IV.

Ces tableaux montrent que l'effet de masse varie: (1) avec la masse atomique de l'élément étudié, et (2) avec la masse atomique de l'élément combiné à celui-ci.

Bibliographie p. 22/23.

TABLEAU III

EFFET DE MASSE DANS L'ÉLECTROMIGRATION DES MÉTAUX

Isotopes	*Milieu fondu*	*Effet de masse*
Li	LiCl	0.14
Li	LiBr	0.26
Li	$LiNO_3$	0.05
Zn	$ZnCl_2$	0.078
Zn	$ZnBr_2$	0.11
K	KNO_3	0.037
Cu	CuCl	0.080
Ag	AgCl	0.064
Cd	$CdCl_2$	0.067
Tl	TlCl	0.040
Pb	$PbCl_2$	0.024

TABLEAU IV

EFFET DE MASSE DANS L'ÉLECTROMIGRATION DES HALOGÈNES

Isotopes	*Milieu fondu*	*Effet de masse*
Cl	$ZnCl_2$	0.043
Cl	TlCl	0.086
Cl	$PbCl_2$	0.052
Br	$PbBr_2$	0.042

Une théorie cinétique simplifiée, indiquerait que la mobilité est directement proportionnelle à $1/\sqrt{M}$ et que l'effet de masse est constant pour tous les éléments. Ces résultats expérimentaux montrent qu'une théorie plus complète doit tenir compte des masses relatives des ions isotopes et des particules du solvant. KLEMM a tenté d'expliquer le mécanisme de la migration en attribuant au milieu liquide une structure quasi cristalline. Le déplacement d'un ion se ferait par une succession de "sauts" d'une position à une autre. Mais, pour que les résultats théoriques vérifient l'expérience, KLEMM[45] admet que les sauts peuvent être de deux types: des "sauts spontanés" dont la fréquence dépend des masses relatives des particules migrantes et des molécules du solvant; et des "sauts induits" indépendants de la masse, et provoqués par l'agitation des particules voisines.

BIBLIOGRAPHIE

[1] E. GLUECKAUF, K. H. BARKER ET G. P. KITT, *Disc. Faraday Soc.*, 7 (1949) 199.
[2] S. W. MAYER ET E. R. TOMPKINS, *J. Am. Chem. Soc.*, 69 (1947) 2866.
[3] T. I. TAYLOR ET H. C. UREY, *J. Chem. Phys.*, 6 (1938) 429.
[4] A. K. BREWER, *J. Am. Chem. Soc.*, 58 (1936) 365.
[5] J. H. GROSSE, *Report A. E. C. D.*, No. 2952, 29 Nov. 1950.
[6] F. MÉNES, E. SAÏTO ET E. ROTH, Communication présentée au Symposium International de Séparation des Isotopes, Amsterdam, Avril 1957.
[7] R. H. BETTS, W. E. HARRIS ET M. D. STEVENSON, *Canad. J. Chem.*, 34 (1956) 65.
[8] F. M. SPEDDING, J. E. POWELL ET H. J. SVEE, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 1393.
[9] H. C. UREY ET L. J. GREIFF, *J. Am. Chem. Soc.*, 57 (1935) 321.

[10] LINDEMANN, *Phil. Mag.*, 38 (1919) 173
[11] F. W. ASTON, *Mass Spectra and Isotopes*, Edward Arnold and Co., London 1942, p. 33.
[12] E. GLUECKAUF ET G. P. KITT, Communication présentée au Symposium International de Séparation des Isotopes, Amsterdam, Avril 1957.
[13] M. CHEMLA ET P. SUE, *Compt. rend.*, 236 (1953) 2397.
[14] J. KENDALL, *Nature*, 150 (1942) 136.
[15] M. CHEMLA, Communication présentée au Symposium International de Séparation des Isotopes, Amsterdam, Avril 1957.
[16] A. BONNIN, M. CHEMLA ET P. SUE, *Compt. rend.*, 241 (1955) 40.
[17] A. BONNIN, *ibid.*, 244 (1957) 2708.
[18] A. BONNIN ET M. CHEMLA, *ibid.*, 243 (1956) 1112.
[19] M. CHEMLA ET A. BONNIN, *ibid.*, 241 (1955) 1288.
[20] M. CHEMLA, *ibid.*, 242 (1956) 1450.
[21] C. MANGALO, H. J. ARNIKAR ET M. CHEMLA., *ibid.*, 244 (1957) 2796.
[22] A. K. BREWER, S. L. MADORSKY ET J. W. WESTHAVER, *Science*, 104 (1946) 156.
[23] A. K. BREWER, S. L. MADORSKY *et al.*, *J. Res. Natl. Bur. Stand.*, 38 (1947) 137.
[24] S. L. MADORSKY ET S. STRAUS, *ibid.*, 38 (1947) 185.
[25] S. L. MADORSKY ET S. STRAUS, *ibid.*, 41 (1948) 41.
[26] S. L. MADORSKY *et al.*, U.S. Patent No. 2,645,610, 14 Juillet 1953.
[27] E. R. RAMIREZ, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 6237.
[28] A. KLEMM, *Naturwiss.*, 32 (1944) 69.
[29] A. KLEMM, *Z. Naturforsch.*, 2a (1947) 9.
[30] A. KLEMM, H. HINTENBERG ET P. HOERNES, *ibid.*, 2a (1947) 245.
[31] A. KLEMM, *ibid.*, 6a (1951) 512.
[32] A. KLEMM, *ibid.*, 7a (1952) 417.
[33] A. KLEMM, *ibid.*, 1 (1946) 252.
[34] A. KLEMM ET E. U. MONSE, *ibid.*, 12a (1957) 319.
[35] A. KLEMM ET A. LUNDEN, *ibid.*, 10a (1955) 282.
[36] A. LUNDEN ET W. HERZOG, *ibid.*, 11a (1956) 520.
[37] A. E. CAMERON, W. HERR, W. HERZOG ET A. LUNDEN, *ibid.*, 11a (1956) 203.
[38] A. KLEMM, H. HINTENBERGER ET A. LUNDEN, *ibid.*, 6a (1951) 489.
[39] S. FLOBERG, A. KLEMM ET C. LANG, *ibid.*, 8a (1953) 562.
[40] A. LUNDEN ET E. BERNE, *ibid.*, 9a (1954) 684.
[41] A. LUNDEN, G. HORLITZ ET P. SIGNER, *ibid.*, 11a (1956) 280.
[42] A. LUNDEN, *ibid.*, 11a (1956) 590.
[43] A. LUNDEN, C. REUTERSWARD ET N. G. SJÖBERG, *ibid.*, 10a (1955) 279.
[44] A. LUNDEN, E. U. MONSE ET N. G. SJÖBERG, *ibid.*, 11a (1956) 75.
[45] A. KLEMM, *J. Chim. Phys.*, 49 (1952) C 18.

Reçu le 17 septembre 1957

REVUE D'ENSEMBLE

APPLICATIONS DE LA MICROCHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR COUCHES MINCES

E. DEMOLE

Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris (France)

CHROMATOSTRIPS

En 1951, KIRCHNER, MILLER ET KELLER[1] ont décrit une technique microchromatographique d'adsorption basée sur l'emploi de lames de verre supportant une mince couche adsorbante minérale ("chromatostrips").

Il s'agissait d'une adaptation de la chromatographie radiale d'ions inorganiques selon MEINHARD ET HALL[2].

Un chromatostrip se prépare généralement à partir d'une bande de verre de 12 × 1.2 cm, sur une face de laquelle on étend une pâte composée d'un adsorbant, d'eau et d'un agent liant tel que l'amidon. Après dessiccation, la couche adsorbante devient dure et est épaisse de 0.5 mm environ.

Chaque chromatostrip permet l'exécution d'un microchromatogramme ascendant; on dépose quelques μg de la substance à examiner sur l'adsorbant, à peu de distance d'une extrémité de la lame; on plonge cette extrémité dans le solvant choisi pour le développement, la lame étant disposée verticalement, par exemple dans un tube à essais de dimensions convenables. L'ascension capillaire du solvant, très rapide, porte à environ 30 minutes la durée nécessaire au développement du microchromatogramme.

Il ne reste plus ensuite qu'à noter l'emplacement des constituants du mélange chromatographié, distribués sous forme de spots entre le point de départ du microchromatogramme et le niveau atteint par le front du solvant. Dans le cas—fréquent—où l'on chromatographie des substances incolores, on localise ces spots à l'aide de réactions chimiques colorées (révélation).

Il convient de souligner ici que les séparations obtenues sur chromatostrips résultent d'un processus d'adsorption "vraie". De ce fait, cette méthode diffère sensiblement de la technique de la chromatographie sur papier, basée sur un mécanisme de partage.

CHROMATOPLAQUES (CHROMATOPLATES)

Toute méthode chromatographique valable doit conduire à des résultats précis et

Bibliographie p. 33/34.

reproductibles. Or, les séparations sur chromatostrips sont influencées par le degré d'activation de l'adsorbant, ainsi que par son épaisseur. La constance de ces deux facteurs doit donc être assurée, d'une part par l'emploi d'un appareil spécial produisant des couches adsorbantes d'épaisseur connue[3,4], d'autre part en déshydratant celles-ci dans des conditions standard.

On obtient alors des séparations reproductibles à $\pm$ 0.05 R_F près[5], à condition de protéger encore les chromatostrips de l'humidité atmosphérique au cours des manipulations. Celles-ci s'avèrent dans l'ensemble assez délicates.

REITSEMA, en 1954[6], a remarquablement simplifié la méthode en utilisant des *chromatoplaques* ou larges chromatostrips, sur lesquels on exécute simultanément plusieurs microchromatogrammes. Les différentes séparations obtenues sur une même plaque sont rigoureusement comparables, sous l'unique condition d'une grande régularité dans la répartition de l'adsorbant.

Comparaison des chromatographies sur papier et sur chromatoplaques

Ces deux procédés, à côté de qualités communes, présentent chacun des possibilités en rapport avec le mécanisme physico-chimique qui les caractérise (partage ou adsorption "vraie").

Par exemple, les chromatographies des substances hydrosolubles, devenues classiques sur le papier (acides aminés, sucres), ne semblent pas praticables sur chromatoplaques. Il en va de même pour le fractionnement de séries homologues, relativement aisé sur le papier, les coefficients de partage variant régulièrement avec l'allongement des chaînes carbonées.

Les substances liposolubles, de polarité généralement modérée, constituent le meilleur champ d'application des chromatoplaques. Parmi les avantages présentés par ces dernières, nous devons signaler en premier lieu leur rapide et facile mise au point; le solvant, choisi selon son pouvoir éluant comme dans le cas des chromatographies sur colonnes, est homogène et certains facteurs tels que la température ambiante et la quantité de substance chromatographiée s'avèrent sans influence, dans des limites raisonnables. Enfin, la durée du développement des chromatoplaques est remarquablement courte (entre 15 et 30 minutes usuellement) et l'adsorbant (que l'on peut varier selon les cas) supporte l'action de réactifs de révélation énergiques.

Il n'est pas exclu que, dans l'avenir, on puisse adapter les chromatoplaques au principe de la chromatographie de partage. Pour l'instant, cette méthode constitue un excellent procédé de contrôle ou d'investigation préliminaire, rapide et souple. La chromatographie sur papier, quelquefois moins maniable mais plus précise du fait du grand trajet couvert par la phase mobile, assure mieux l'identification rigoureuse des substances par leur R_F.

DOMAINES D'APPLICATION DES CHROMATOPLAQUES

Les publications originales de KIRCHNER *et al.*[1,5,7–10] donnent une bonne idée de l'envergure de la méthode, utilisée pour la recherche et l'identification des diverses substances, de nature souvent terpénique, composant les huiles essentielles.

Bibliographie p. 33/34.

Plus récemment, d'autres auteurs l'ont encore utilisée dans le même but[3,11-15] et ONOE[16] l'a employée pour la séparation de dinitrophénylhydrazones d'aldéhydes aliphatiques.

REITSEMA[6] a en outre effectué l'étude comparative d'une série d'huiles essentielles sur les chromatoplaques qu'il a mis au point, et WAGNER[17] a examiné quelques phénols par le même procédé. D'autres publications mentionnent l'usage des chromatostrips pour la séparation d'azulènes[3,27] et, tout récemment, pour l'étude de peroxydes organiques[28] et de coumarines[29]. Ceci, joint aux exemples inédits de séparations de caroténoïdes, pigments tétrapyrroliques et diterpènes que nous donnons plus loin (Figs. 1–4), prouve que la méthode possède un intérêt très général.

Adsorbants et solvants généralement utilisés

Dans le domaine des huiles essentielles, l'adsorbant le plus généralement utilisé sur chromatoplaques est *l'acide silicique*. Les couches siliciques possèdent non seulement d'excellentes propriétés mécaniques (dureté, etc...), mais aussi une sélectivité remarquable vis-à-vis des composants oxygénés de ces essences. A notre avis, cette sélectivité peut s'expliquer par un processus d'adsorption comportant l'établissement de liaisons hydrogène entre l'acide silicique et les corps adsorbés[18,19]; les molécules contenant des atomes à doublets électroniques libres (O, N) sont particulièrement touchées par ce mécanisme et plus ou moins retenues selon la polarité et l'empêchement stérique de ces centres actifs.

En général, l'acide silicique ménage très bien les substances délicates. Nous avons chromatographié, sur cet adsorbant employé aussi bien en colonnes que sur chromatoplaques, des alcools allyliques diterpéniques acycliques[20]; les séparations étaient bonnes et aucun signe de déshydratation ou d'isomérisation n'a été relevé.

Dans des cas spéciaux, on peut cependant avoir intérêt à n'utiliser l'acide silicique qu'après désactivation partielle [21].

KIRCHNER *et al.*[1] ont décrit plusieurs mélanges de solvants de développement. Comme en toute chromatographie d'adsorption, on doit accorder le pouvoir éluant du solvant à l'affinité de la substance pour l'adsorbant, déterminée par essais préliminaires.

Dans le domaine des huiles essentielles, les mélanges d'acétate d'éthyle avec l'hexane ou le benzène sont souvent utilisés avec de bons résultats (proportion comprise généralement entre 10 et 20% d'acétate d'éthyle).

Méthodes de révélation

KIRCHNER *et al.* (*loc. cit.*) ont imaginé différentes méthodes de révélation qualitatives en rapport avec la nature des corps adsorbés. Ainsi, ils détectent les substances insaturées par "effet de masque" sur un adsorbant fluorescent, selon le principe de la technique de SEASE[22]: les spots apparaissent en sombre sur fond brillant par éclairage ultra-violet de courte longueur d'onde.

REITSEMA[6] a également utilisé les possibilités de l'éclairage ultra-violet.

Les substances colorées ou fluorescentes ne posent évidemment aucun problème quant à leur détection.

Bibliographie p. 33/34.

Une méthode de révélation chimique des substances insaturées, par l'action combinée de la fluorescéine et des vapeurs de brome, a aussi été décrite par KIRCHNER *et al.*[1]. Ces mêmes auteurs utilisent en outre l'*o*-dianisidine en solution acétique pour localiser les aldéhydes, et le vert de bromocrésol, préconisé par RAMSEY ET PATTERSON[23], pour les acides. Ils révélent encore les substances organiques particulièrement inertes par l'acide sulfurique concentré à froid, ou même par l'action d'un mélange sulfo-nitrique à chaud; les couches adsorbantes contiennent, dans ces derniers cas, du plâtre comme agent liant, au lieu de l'amidon ordinairement utilisé[1].

D'autres réactions chimiques de révélation peuvent être imaginées, selon la nature fonctionnelle des substances chromatographiées. Citons la détection des cétones et aldéhydes par l'action de 2,4-dinitrophénylhydrazine en solution chlorhydrique selon REITSEMA[6], et celle des phénols par couplage avec l'acide sulfanilique diazoté, selon WAGNER[17].

Nous décrivons nous-même quelques réactions inédites. Ainsi, le permanganate de potassium très dilué, ou les vapeurs d'iode à chaud, révèlent bien les *substances insaturées* ou facilement déshydratables. Les *phénols* peuvent être détectés par la *p*-nitroaniline diazotée préparée selon RAYBURN *et al.*[24], ou par le chlorure ferrique en solution hydro-alcoolique. La *p*-nitroaniline diazotée révèle d'ailleurs toute substance copulable comme, par exemple, *l'indole* (réaction rouge). La ninhydrine peut être utilisée, comme en chromatographie sur papier, pour localiser les *amines primaires*[25].

Nous décrivons plus loin (partie expérimentale) une technique de détection des *esters volatils* par une adaptation de la réaction hydroxamique décrite par FEIGL[26].

Toutes ces réactions permettent l'utilisation des chromatoplaques comme méthode d'analyse qualitative ou semiquantitative. KIRCHNER *et al.*[9] ont aussi montré une possibilité d'adapter leur technique au stade quantitatif.

Réactions microchimiques sur chromatostrips ou chromatoplaques

La reproductibilité des R_F sur chromatostrips est de l'ordre de $\pm$ 0.05[5]. Cette excellente précision ne permet pourtant pas l'identification formelle des composants des huiles essentielles, d'après leurs seuls R_F, même déterminés dans plusieurs solvants. C'est pourquoi MILLER ET KIRCHNER[5] dégradent ou dérivent certaines substances avant microchromatographie et obtiennent de nouveaux produits permettant une caractérisation plus sûre du corps initial. Certaines de ces réactions sont effectuées directement sur l'adsorbant, en recouvrant la substance d'une goutte de réactif avant le développement. Des oxydations (CrO_3), déshydratations (H_2SO_4), réductions ($LiAlH_4$), dérivations en semicarbazones et phénylhydrazones ont été effectuées ainsi localement sur chromatostrips.

D'autres transformations ont été de préférence exécutées en micro-tubes (hydrolyse alcaline à chaud, formation d'uréthanes); en ce cas, une goutte du produit réactionnel brut ést chromatographiée.

Ces réactions microchimiques permettent la caractérisation d'une série de substances naturelles par les chromatoplaques. Le citral, par exemple, peut être

Bibliographie p. 33/34.

oxydé en acide géranique (par H_2O_2) et celui-ci réduit en géraniol, séquence assurant l'identification certaine.

Utilisation des chromatoplaques pour la mise au point de chromatographies à l'échelle préparative

Des substances appartenant à tous les groupements fonctionnels principaux ont été chromatographiées sur chromatoplaques; tout produit de polarité modérée et de solubilité convenable peut en principe être examiné par cette méthode, même s'il est relativement volatil, comme l'aldéhyde butyrique par exemple[6].

En outre, les microchromatogrammes réussis sur chromatoplaques peuvent être reproduits sur une colonne de même adsorbant, à l'échelle préparative. On possède ainsi un moyen de mettre rapidement au point les grands chromatogrammes liquides, tout en dépensant peu de substance[1,7]. Toutefois, sous toutes conditions égales, les colonnes sont un peu moins sélectives que les chromatoplaques; ceci s'explique par la diffusion des bandes sur les colonnes. De plus, certains mélanges de solvants subissent une chromatographie frontale sur chromatoplaques. Ce phénomène, qui peut influencer favorablement certaines séparations délicates, n'est pas reproduit sur les colonnes préparées par sédimentation de l'adsorbant dans un excès de solvant.

La marche d'un chromatogramme liquide peut être suivie avec précision par

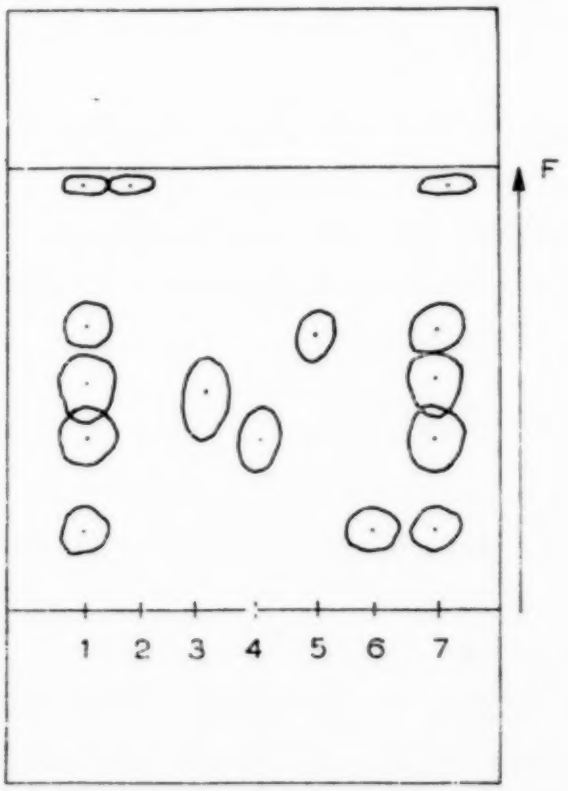


Fig. 1. Séparation de caroténoïdes sur chromatoplaques. 5 à 10 γ déposés en solution acétonique. 2 = β-Carotène R_F 0.96, 3 = Bixine R_F 0.51; 4 = Canthaxanthine R_F 0.38; 5 = Isozéaxanthine R_F 0.63; 6 = Zéaxanthine R_F 0.17; 1, 7 = Mélange. Adsorbant: acide silicique, couche de 0.3 mm. Solvant: *n*-hexane–éther 3:7 (v/v). Trajet du front du solvant: 76 mm. Durée du développement: 15 minutes.

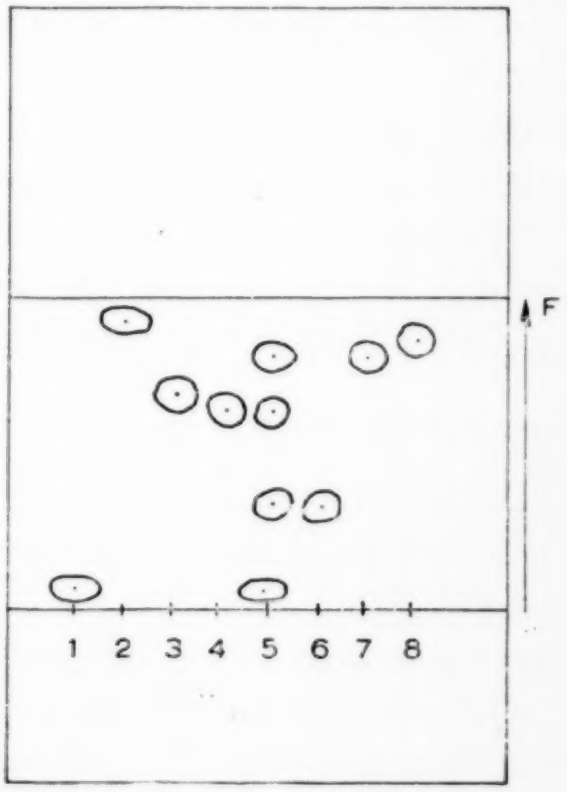


Fig. 2. Séparation de pigments tétrapyrroliques sur chromatoplaques. Porphyrines (esters méthyliques) et bilirubine déposés en solution benzénique; biliverdine en solution alcoolique. 1 = Biliverdine 3 γ R_F 0.06; 2 = Bilirubine, 7 γ R_F 0.92; 3 = Coproporphyrine I ester, 7 γ R_F 0.68; 4 = Coproporphyrine III ester, 15 γ R_F 0.63; 6 = Uroporphyrine I ester, 9 γ R_F 0.33; 7 = Deutéroporphyrine ester, 3 γ R_F 0.80; 8 = Protoporphyrine ester, 5 γ 0.85 R_F; 5 = Mélange de 1, 4, 6, 7. Adsorbant: acide silicique, couche de 0.3 mm. Solvant: benzène 90, acétate d'éthyle 20, alcool éthylique 7.5 (v/v). Trajet du front du solvant: 54 mm. Durée du développement: 15 minutes.

Bibliographie p. 33/34.

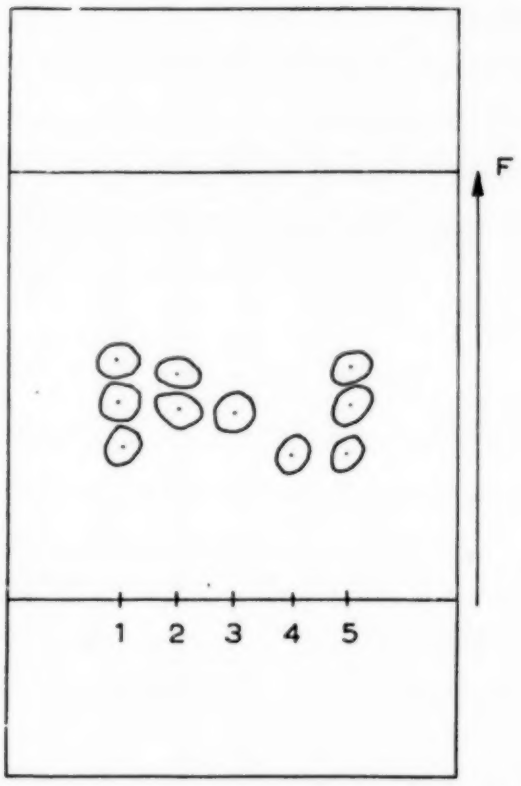


Fig. 3. Séparation de diterpénoïdes de la classe du phytol sur chromatoplaques. 10 γ, déposés en solution dans le *n*-hexane. 1 et 5 = Mélange isophytol + diterpène inconnu + phytol. 2 = Mélange isophytol + diterpène inconnu. 3 = Diterpène inconnu. 4 = Phytol. Phytol, R_F 0.34–0.35. Diterpène inconnu R_F 0.44–0.46. Isophytol R_F 0.53–0.55. Adsorbant: acide silicique, couche de 0.3 mm. Solvant: acétate d'éthyle–*n*-hexane 1:4 (v/v). Trajet du front du solvant: 74 mm. Durée du développement: 15 minutes. Révélation: par l'action de $KMnO_4$ à 0.25% dans H_2O.

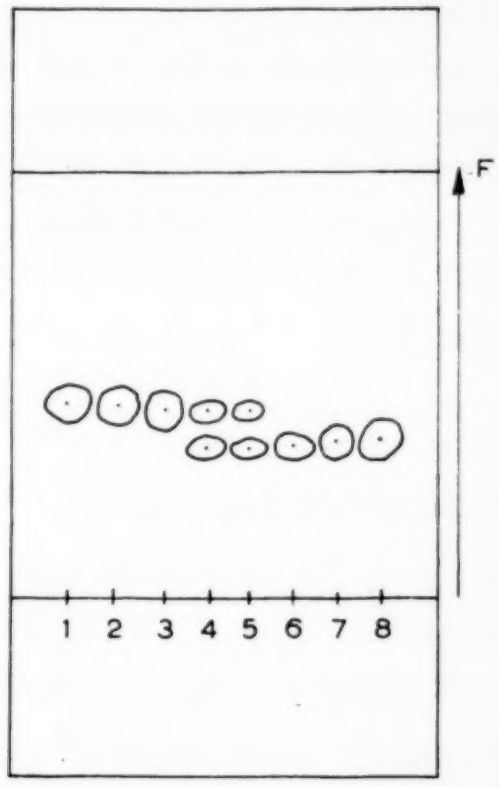


Fig. 4. Contrôle d'un chromatogramme liquide sur chromatoplaque. Quelques γ de chacune des 8 fractions résultant d'une chromatographie préparative sur colonne ont été chromatographiés sur cette plaque. Le processus du fractionnement apparaît ainsi clairement; les fractions 4 et 5 sont encore des mélanges. Mélange étudié: phytol + diterpène inconnu. Cette chromatoplaque a été effectuée à peu près aux mêmes conditions que la précédente.

le contrôle de chaque éluat sur chromatoplaque. On distingue ainsi rapidement les fractions homogènes des mélanges intermédiaires[7]. Nous donnons plus loin un exemple d'un tel contrôle.

Utilisation des chromatoplaques à l'échelle micropréparative

Nous avons pu chromatographier jusqu'à 1 mg de substance sur des chromatostrips spécialement épais (1 mm d'adsorbant). Après le développement, nous avons découpé l'adsorbant à l'emplacement des divers spots (localisés par comparaison avec un chromatostrip témoin révélé chimiquement) et l'avons extrait avec un solvant approprié. Les micro-éluats obtenus contenaient suffisamment de matière pour étude spectrographique ou microchimique ultérieure.

Il va sans dire que des chromatoplaques épaisses permettraient de réaliser tout aussi bien la même opération.

Conclusions

Dans les Figs. 1–4, nous illustrons les possibilités d'emploi des chromatoplaques par plusieurs séparations inédites obtenues dans les domaines des caroténoïdes, pigments tétrapyrroliques et diterpènes.

Bibliographie p. 33/34.

La partie expérimentale contient ensuite la description détaillée de la préparation des chromatoplaques, de leur usage, ainsi que de certains procédés de révélation inédits intéressant les substances insaturées, les phénols et les esters.

Nous croyons que l'usage des chromatoplaques est appelé à se répandre encore, car il est rare de rencontrer une méthode analytique donnant autant de résultats pour si peu de moyens mis en œuvre.

PARTIE EXPERIMENTALE

Préparation des chromatoplaques

Nous utilisons des plaques de verre de 17 × 11 × 0.2 cm et un acide silicique 100 mesh (analytical reagent, Mallinckrodt Co.). Les plaques sont recouvertes selon le procédé de REITSEMA[6], légèrement modifié en ce qui concerne le chauffage du mélange silicique:

On ajoute 54 ml d'eau à un mélange de 28.5 g d'acide silicique avec 1.5 g d'amidon de riz*. Bien malaxer le tout, chauffer au voisinage de l'ébullition (sur un bec de gaz et non au bain-marie) jusqu'à obtenir l'épaississement maximum de la masse (2–3 minutes); ce détail est important car son observation permet d'éviter le craquèlement des couches à la dessiccation. Ensuite on dilue avec 20–30 ml d'eau, chauffe à nouveau rapidement au voisinage de l'ébullition et laisse refroidir. Le mélange est prêt pour le recouvrement des plaques.

On verse 10 ml de suspension silicique amidonnée au centre de chaque plaque; le liquide est immédiatement réparti sur toute la surface du verre au moyen d'une spatule. Quelques rapides secousses transversales achèveront la répartition régulière du film liquide. Après séchage partiel sur un plan bien horizontal, à température ambiante, les plaques peuvent être introduites dans une étuve réglée à 100–105° C. Dans ces conditions, on obtient des surfaces actives de 0.5 mm d'épaisseur environ, sans craquelures et suffisamment dures pour supporter des inscriptions au crayon.

Seule la zone centrale de ces chromatoplaques donne des microchromatogrammes rigoureusement comparatifs, car la couche silicique s'amincit progressivement vers les bords. Ce défaut, dû à l'étalement "en ménisque" du liquide amidonné, n'entrave pas l'exécution des travaux les plus courants sur chromatoplaques. On constate seulement une légère augmentation des R_F sur les zones marginales des plaques (effet de bord).

Cependant, une répartition plus uniforme de la couche adsorbante peut être obtenue par l'emploi d'un appareil spécial. Nous utilisons dans ce but un instrument commercial destiné normalement à la production de minces couches de peintures. Cet instrument se compose d'un couteau métallique glissant à distance réglable au-dessus d'une surface plane; l'ensemble est disposé horizontalement. On verse un excès de mélange amidonné sur une plaque placée sur cet appareil dont on a, au préalable, réglé convenablement l'écart du couteau. En faisant glisser celui-ci par

* La nature de l'amidon est importante.

Bibliographie p. 33/34.

dessus la plaque, on chasse l'excès de liquide et ne laisse qu'un film de l'épaisseur désirée.

Nous obtenons par cette méthode des chromatoplaques de 0.3 mm d'épaisseur où l'effet de bord est absent, sauf dans les parties marginales extrêmes (que nous éliminons d'ailleurs par grattage de 10 à 15 mm d'adsorbant de chaque côté des plaques).

Marquage des chromatoplaques

Le marquage s'effectue au crayon mou sur l'adsorbant bien sec. On trace les points de départ des microchromatogrammes, espacés de 8 à 10 mm, sur une droite située à 30 mm de la base des plaques.

On peut effectuer jusqu'à 10 microchromatogrammes par chromatoplaque possédant les dimensions indiquées plus haut.

Après marquage, on remet les chromatoplaques à l'étuve pour leur activation définitive, durant 30 minutes à 100–105° C. On les introduit encore chaudes dans un dessiccateur à potasse ou chlorure de calcium et les utilise dès refroidissement; on peut aussi les conserver indéfiniment à l'abri de l'humidité.

Dépôt des substances à chromatographier

Le dessiccateur contenant les chromatoplaques doit posséder une petite ouverture supérieure permettant le passage des micropipettes portant les solutions des substances à étudier. On opère ainsi pratiquement à l'abri de l'humidité atmosphérique.

On dépose, sur chaque repère des chromatoplaques, 5 à 10 mm^3 de solution représentant une quantité appropriée de substance (en général 5 à 10 γ); celle-ci doit être dissoute dans un solvant volatil peu polaire (pentane, éther, etc...).

Développement des chromatoplaques

On dispose les chromatoplaques dans un petit bac (21 × 12 × 4 cm) fermé par une plaque de verre rodée et contenant 100 ml de solvant. Les plaques, maintenues à peu près verticalement, plongent de 2 cm dans le liquide.

En 15 à 30 minutes le développement est terminé, le front du solvant s'étant élevé de 8 à 10 cm. On n'a généralement pas intérêt à prolonger l'opération car les spots commenceraient à diffuser. D'ailleurs, la vitesse de migration du solvant, très rapide au début, n'est plus que faible après un déplacement de 8 cm environ.

On retire les plaques, note l'emplacement du front du solvant, et laisse sécher à température douce (50° C).

Solvants de développement

Les mélanges d'acétate d'éthyle et d'hexane, fréquemment utilisés par les auteurs originaux, constituent de bons solvants de développement à usage général. Une proportion de 15 à 20% d'acétate d'éthyle convient à la séparation des substances oxygénées peu polaires, jusqu'aux monophénols.

D'autres mélanges de solvants peuvent être établis. Ceux dont les constituants

Bibliographie p. 33/34.

ont des polarités différentes donnent souvent les meilleurs résultats: ce type de solvant subit vraisemblablement une chromatographie frontale retardant la progression du constituant le plus polaire; deux fronts d'élution naissent ainsi, séparés par un gradient de concentration pouvant améliorer certaines séparations.

Techniques de révélation particulières

(*a*) *Révélation avec* $KMnO_4$: On verse, à température ambiante, un excès d'une solution de permanganate de potasse à 0.25–0.50% dans l'eau, sur l'ensemble de la surface des chromatoplaques. Celles-ci doivent être, au préalable, bien débarrassées de leur solvant de développement.

Les spots foncés correspondant aux substances oxydables apparaissent presque immédiatement. Après environ 10 secondes, on immerge les plaques dans l'eau courante pour chasser l'excès de permanganate (les couches siliciques, convenablement préparées, supportent sans se dissocier un contact prolongé avec l'eau). Après lavage, on retire les chromatoplaques et les laisse sécher.

On obtient des spots brunâtres bien nets sur fond blanc.

(*b*) *Révélation avec les vapeurs d'iode*: Cette méthode, moins commode que la précédente, peut être utile pour la recherche des substances susceptibles de se déshydrater à chaud.

Les chromatoplaques sont préchauffées à 100–150° C, puis plongées brusquement dans une atmosphère de vapeurs d'iode. Après quelques secondes, on les retire et les chauffe à nouveau pour chasser l'iode en excès.

On obtient des spots bruns sur fond presque blanc. L'amidon contenu dans l'adsorbant n'interfère pas.

(*c*) *Usage de p-nitroaniline diazotée pour l'étude et la détection des phénols*: On pulvérise, sur les chromatoplaques bien sèches, le mélange suivant que l'on prépare au moment de l'emploi:

1 volume de solution aqueuse à 0.7 g de *p*-nitroaniline et 9 ml de HCl concentré pour 100 ml.

1 volume de $NaNO_2$ à 1%.

2 volumes de $NaHCO_3$ à 5%.

On laisse ensuite sécher les plaques à 40–50° C. Les phénols apparaissent à l'état de taches brunâtres.

RAYBURN *et al.*[24] ont effectué l'analyse de mélanges de phénols par chromatographie sur papier des colorants résultant de leur couplage avec la *p*-nitroaniline diazotée. Nous avons transposé cette méthode sur chromatoplaque ainsi:

On dépose 10 γ de chaque phénol ou mélange à examiner (solutions méthanoliques) sur les points de départ d'une chromatoplaque. On pulvérise, sur les mêmes emplacements, le réactif mentionné plus haut, le reste de la surface adsorbante étant protégé par un cache. Après 10 à 15 minutes de séchage à 40–50° C, on laisse la plaque refroidir dans un dessiccateur, puis développe avec le mélange *n*-hexane/éther 2:1. On pulvérise enfin, sur la plaque développée sèche, une solution de Na_2CO_3 à 10%, ce qui provoque l'apparition de teintes caractéristiques permettant, conjoin-

Bibliographie p. 33/34.

tement avec les R_F, l'identification des phénols ou types de phénols mis en jeu.

(*d*) *Révélation avec le chlorure ferrique*: L'action d'une solution à 5% de $FeCl_3$ dissous dans méthanol–eau 1:1 permet aussi la détection de certains phénols ou énols. On opère éventuellement à 30–40° C.

(*e*) *Révélation des esters*: La recherche directe d'esters volatils sur chromatoplaques peut se faire par une adaptation de la réaction hydroxamique décrite par FEIGL[26]. Cette réaction, trop peu sensible lorsqu'on l'effectue sur l'acide silicique, doit être reportée sur papier de la façon suivante:

La couche active de la chromatoplaque à révéler, sèche de tout solvant organique, est humidifiée par une légère pulvérisation d'eau puis recouverte d'une feuille de papier Whatman No. 1 de mêmes dimensions, préalablement imprégnée d'hydroxylamine (voir ci-dessous). On dépose sur le tout une plaque de verre maintenant le papier bien appliqué sur l'acide silicique et place cet assemblage sur une surface légèrement chaude (30–45° C). Les esters s'évaporent avec l'humidité de l'acide silicique et viennent se fixer dans le papier imprégné d'hydroxylamine, où ils passent à l'état d'acides hydroxamiques.

Après un délai variable (10–15 minutes à 30° C pour les esters benzyliques simples) on retire la feuille sur laquelle on pulvérise une solution de 5% de $FeCl_3$ dans HCl 0.5 *N*. On observe l'apparition de spots violacés caractéristiques correspondant à l'emplacement d'esters sur la chromatoplaque originale.

Cette méthode permet de détecter facilement 6 γ d'acétate de benzyle par exemple. Les esters trop peu volatils ne sont par contre pas décelés. Le solvant utilisé pour le développement des chromatoplaques examinées par ce procédé doit naturellement être exempt d'esters.

Préparation du papier imprégné d'hydroxylamine: On mélange, au moment de l'emploi, volumes égaux d'une solution à 7 g de $NH_2OH \cdot HCl$ dans 100 ml d'eau et d'une solution à 12 g de KOH pour 100 ml de CH_3OH. On pulvérise ce mélange sur le papier à imprégner, que l'on utilise immédiatement, encore humide.

REMERCIEMENTS

Nous sommes vivement reconnaissant à Monsieur E. LEDERER de l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Nous remercions également les Etablissements Firmenich, Genève, pour leur aide financière et la fourniture de certaines des substances que nous avons étudiées sur chromatoplaques.

BIBLIOGRAPHIE

1 J. G. KIRCHNER, J. M. MILLER ET G. J. KELLER, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 420.
2 J. E MEINHARD ET N. F. HALL, *Anal. Chem.*, 21 (1949) 185.
3 E. STAHL, G. SCHRÖTER, G. KRAFT ET R. RENZ, *Die Pharmazie*, 11 (1956) 633.
4 J. M. MILLER ET J. G. KIRCHNER, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 2002.
5 J. M. MILLER ET J. G. KIRCHNER, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 1107.
6 R. H. REITSEMA, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 960; *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Edit.*, 43 (1954) 414.
7 J. M. MILLER ET J. G. KIRCHNER, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 1480.

[8] J. G. KIRCHNER ET J. M. MILLER, *Ind. Eng. Chem.*, 44 (1952) 318.
[9] J. G. KIRCHNER, J. M. MILLER ET R. G. RICE, *Agric. and Food Chem.*, 2 (1954) 1031.
[10] J. M. MILLER ET J. G. KIRCHNER, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 428.
[11] J. LABAT ET A. L. MONTES, *Anales asoc. quim. argentina*, 41 (1953) 166; *C. A.*, 48 (1954) 3637f.
[12] M. ITO, S. WAKAMATSU ET H. KAWAHARA, *J. Chem. Soc. Japan*, 75 (1954) 413; *C. A.*, 48 (1954) 13172d.
[13] S. GRÜNER ET W. SPAICH, *Arch. Pharm. Ber. deut. pharm. Ges.*, 287 (1954) 243.
[14] I. ONISHI, H. TOMITA ET T. FUKUZUMI, *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, 20 (1956) 61.
[15] R. G. W. SPICKETT, *Chem. and Ind.*, (1957) 561.
[16] K. ONOE, *Chem. Zentralbl.*, 127 (1956) 3958.
[17] G. WAGNER, *Die Pharmazie*, 10 (1955) 302.
[18] R. S. MC. DONALD, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 850.
[19] V. N. FILIMONOV, *Optika i Spektroskopiya*, 1 (1956) 490; *C. A.*, 51 (1957) 6271e.
[20] E. DEMOLE, *Compt. rend.*, 243 (1956) 1883.
[21] J. H. LINFORD, *Canad. J. Biochem. and Physiol.*, 34 (1956) 1153.
[22] J. W. SEASE, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 (1948) 3630.
[23] L. L. RAMSEY ET W. L. PATTERSON, *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 31 (1948) 139.
[24] C. H. RAYBURN, W. R. HARLAN ET H. R. HANMER, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 1419.
[25] J. M. BREMNER ET R. H. KENTEN, *Biochem. J.*, 49 (1951) 651.
[26] F. FEIGL, *Spot Tests in Organic Analysis*, 5th Ed., Elsevier, Amsterdam, 1956, p. 237.
[27] S. FUKUSHI ET Y. OBATA, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 27 (1953) 353; *C.A.*, 50 (1956) 15027-f.
[28] K. MARUYAMA, *J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect.*, 77 (1956) 1496; *Analyt. Abstr.*, 4 (1957) 3002.
[29] W. L. STANLEY ET S. H. VANNIER, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 3488.

Reçu le 11 septembre 1957

A SENSITIVE DETECTOR FOR GAS CHROMATOGRAPHY

J. E. LOVELOCK

National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, N.W.7 (England)

The growing importance of gas chromatography as a method for the analysis and separation of complex mixtures of volatile substances has increased the need for physical methods of measuring the concentration of vapours in the gas stream emerging from the chromatography column.

A critical comparison of the methods at present in use together with a discussion of desiderata for an ideal detector has been given by JAMES[1] and of the detectors at present in practical use, namely the Katharometer, the hydrogen flame detector SCOTT[2], the ionisation cross section detector DEAL *et al.*[3] and the gas density balance MARTIN AND JAMES[4] only the last approaches the ideal requirements. The others are either insensitive or have responses which are non-linear, and unrelated to any simple molecular parameter so that calibration for each substance to be detected may be necessary.

The continuing quest for an ideal detector has stimulated interest in other possible physical methods of detection. The most fruitful of these have been methods based on the ionisation properties of gases. In addition to the detector already mentioned which depends for its action on the differences in the ionisation cross section of different molecular species, two methods have recently been described which use the well known sensitivity of a low pressure gas discharge to small changes in the composition of the gas, HARLEY AND PRETORIUS[5], RYCE AND BRYCE[6]. Both of these devices have sensitivities many orders of magnitude greater than those so far described. This paper describes a detector whose method of operation is based on the unique ionisation properties of argon. It has a sensitivity which can be varied over a wide range and which will permit the detection of as little as $2 \cdot 10^{-12}$ moles of most organic substances. In spite of its high sensitivity to vapour composition the device is relatively insensitive to temperature, pressure and gas flow rate. In addition to these desirable properties the detector is simple to construct, and has a response which is closely similar for different molecular species.

General principles of operation

The absorption of ionising radiation by gases produces ions and excited but unionised atoms and molecules. With most gases the life time of the metastable atoms is short, *ca.* 10^{-9} secs., consequently under constant conditions of irradiation the ions which have a comparatively long life time greatly outnumber the excited but non-ionised atoms. The rare gases are unusual in their possession of long lived metastable

References p. 46.

atoms, and in these gases the concentration of metastable atoms approaches that of ions during steady irradiation. In the pure gas the metastable atoms eventually decay to the normal state with the emission of radiation. In the presence of small traces of other gases the metastable rare gas atoms can, during their lifetime, transfer their energy of excitation by collision. If the ionisation potential of the gas molecules is less than the excitation potential of the rare gas atoms the transfer of energy on collision leads to the ionisation of the added gas. The molecules of most organic compounds have ionisation potentials lower than the excitation potential of helium, neon, and argon, and are ionised on collision with the metastable atoms of these noble gases.

The steady level of ionisation in an irradiated gas is easily measured in an ionisation chamber and so is any increase following the addition of another gas or vapour. It follows that a simple gas chromatography apparatus can be based on the use of a rare gas as the carrier gas and an ionisation chamber containing a source of ionising radiation as the detector.

In practice only two rare gases are available in cylinder form and at prices which would permit the economic use of such an apparatus namely helium and argon. By a fortunate coincidence the cheaper of these gases, argon, functions well in the device when used directly from commercial cylinders. Carefully purified helium would do even better but the commercial gas contains sufficient impurity, probably neon and argon, to discharge the metastable helium atoms shortly after their formation. Commercial argon is not necessarily purer than helium, but the excitation potential of metastable argon is lower than that of helium and neon; collision with these gases as impurities does not therefore cause the discharge of the metastable argon.

There follows a description of the construction of a practical detector based on the use of argon as a carrier gas. An account is given of its response under a wide

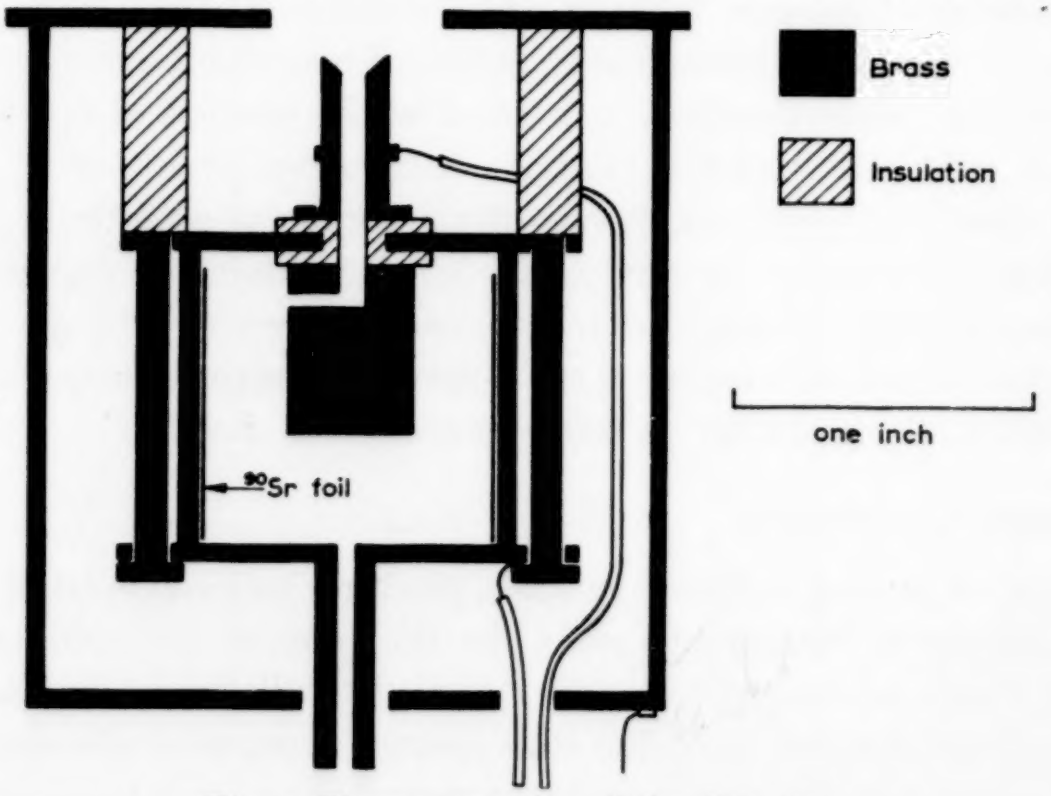


Fig. 1. The construction of the detector.

References p. 46.

variety of operating conditions and with many different substances. The theoretical aspects of its operation are also discussed.

Details of construction

Fig. 1 illustrates the design and dimensions of a typical ionisation chamber suitable for use as a detector. It consists of a central brass collecting electrode, which also serves as the entry port for the gases emerging from the chromatography column. This electrode is insulated from the body of the chamber by means of a poly-tetrafluorethylene washer. The chamber itself is also made of brass and thick enough to shield the radiation source contained within it. The gas is led from the chamber through a short length of brass tubing. In use the outer part of the chamber is at a relatively high potential with respect to earth and frequently at temperatures as high as 200°. The whole chamber is enclosed in an outer jacket of brass or aluminium at earth potential.

Source of ionising radiation

Sealed sources of a wide variety of radio-active isotopes are available commercially for use with industrial thickness gauges. They consist of a small quantity of a compound of some radio-active element firmly bonded in silver foil. Most of the radiation from the element is free to escape the foil but the escape of the isotope itself is virtually impossible. For satisfactory operation with an ionisation chamber of the type just described sufficient radiation to give an ionisation current of 10^{-8} to 10^{-9} amperes is required. With currents smaller than this, expensive amplifiers may be needed and with higher currents the operation of the detector may be impaired by space charge effects. A ten millicurie ^{90}Sr source of β radiation and a 80 microcurie radium source of α radiation have both been found satisfactory. The ^{90}Sr source is to be preferred since the noise level of the device is inversely related to the mean number of ionising particles entering the chamber in unit time and this is nearly 100 times as great from the ^{90}Sr source as from the radium α particle source.

The external radiation from the assembled detector is less than 10 mR per hour at the surface, so that the completed apparatus does not present an external radiation hazard. The exposed sources however are distinctly hazardous and all precautions appropriate to the handling of radio active material should be taken during the assembly and dismantling of the detector.

Amplifier and high voltage supply

The ionisation current of the order of 10^{-8} amperes is most conveniently conveyed to a milliammeter or to a simple pen recorder by a D.C. current amplifier of the type developed by SCROGGIE[7] modified for use with ionisation devices, WELLMAN AND LOVELOCK[8]. The input resistance of the amplifier was $2 \cdot 10^9$ ohms and the steady voltage developed across it by the ionisation current with pure argon flowing in the detector was approximately 20 volts. An equal and opposite voltage was applied to the input of the amplifier from a potentiometer chain so that the indicating meter

References p. 46.

read zero for pure argon, and gave a positive deflection with argon containing organic compounds.

Calibration

The high sensitivity of the detector made calibration a formidable problem. Static methods in which the chamber was filled alternately with pure argon and with a mixture of argon and test vapour were found unsatisfactory. The adsorbtion and desorbtion of small traces of vapour from the walls of the chamber gave unsteady and unreproduceable readings particularly at low vapour concentrations.

Dynamic methods of calibration were therefore used. In these a known quantity of a pure organic substance or mixture of substances was introduced into a stream of pure argon flowing at a constant rate through either a mixing chamber of known volume or a gas chromatograph column, and then through the detector. The rise and fall of ionisation current as the slug of vapour passed through the detector was recorded graphically using a recording milliammeter. The response of the detector to known quantities of different substances was determined from measurements of the area of the peak drawn on the recording paper. The method of introducing known quantities of vapour into the gas stream was as follows. With volatile substances argon was saturated with the vapour by passage through a vessel containing cotton wool soaked with the test substance. The saturating vessel was maintained at 0° in a Dewar flask containing crushed ice and water, the argon saturated at 0° with the test substance was allowed to warm to room temperature by passage through a coil of metal tubing. The vapour issuing from this tubing was drawn several times into a hypodermic syringe to allow the walls of the syringe to equilibrate with the vapour and then a quantity between 0.5 and 10 ml of vapour injected into the gas stream.

With substances of low volatility a known quantity of liquid was transferred using a micro pipette, volume 0.2 microlitres, to the top of a chromatography column, and the vapour passed through the column to the detector by a stream of argon flowing at a constant rate. For these tests the column and the detector were both enclosed in solid aluminium rod maintained at between 100° and 240° according to the rate of emergence of the test substance.

All tests were made at atmospheric pressure; the relative insensitivity of the detector to changes in temperature and pressure, made unnecessary any special precautions to maintain these quantities constant during the course of an experiment. Flow rates were measured with a soap bubble flowmeter, and the potential applied to the ionisation chamber was varied in different tests between 0 and 2000 volts.

RESULTS AND DISCUSSION

JESSE AND SADAUSKIS[9] found that an increase in ionisation occurs when traces of foreign gas are added to the rare gases under conditions of constant irradiation. They reported that the increased ionisation followed the collision of the foreign gas

References p. 46.

molecules with excited but unionised rare gas atoms, and varied with foreign gas concentration according to the relationship developed by STERN AND VOLMER[10]:

$$\frac{1}{\Delta I} = \frac{1}{C}\left(\frac{K_d}{yK_i}\right) + \frac{1}{y} \qquad (1)$$

where ΔI is the increase in ionisation at a concentration of foreign gas C, y is the concentration of excited argon atoms when $C = 0$ and Kd and Ki are constants relating to the cross sections for radiation and ionisation respectively for the excited argon atoms. This relationship predicts an increase in ionisation with increasing concentration of foreign gas rising linearly at first but tending to a constant level at which the excited atoms are discharged by collision immediately they are formed. The response of the detector was found to follow this relationship when the applied potential was less than 300 volts. At higher potentials, in the region of 500 volts the response became linear over a much wider range of concentration, and the sensitivity increased. At still higher potentials the sensitivity increased still further and the response with concentration became non-linear once more but in the opposite sense to that observed at lower potentials so that the ionisation current increased more rapidly than did the concentration and indeed tended to infinity at a finite gas concentration. In practice at voltages above 1000 sparks appeared in the detector chamber when foreign gasses were introduced into the argon stream.

The observed relationship between ionisation current, applied potential, and vapour concentration using methanol as the foreign gas is illustrated in Fig. 2. The improved linearity and sensitivity at higher potentials and the instability at very high potentials can be explained as follows: the negative ions in argon are free electrons and these even at low field strengths have unusually high velocities of agitation, TOWNSEND[11]. As the field strength in the detector is raised the agitation velocities of the free electrons increases until a significant proportion of them

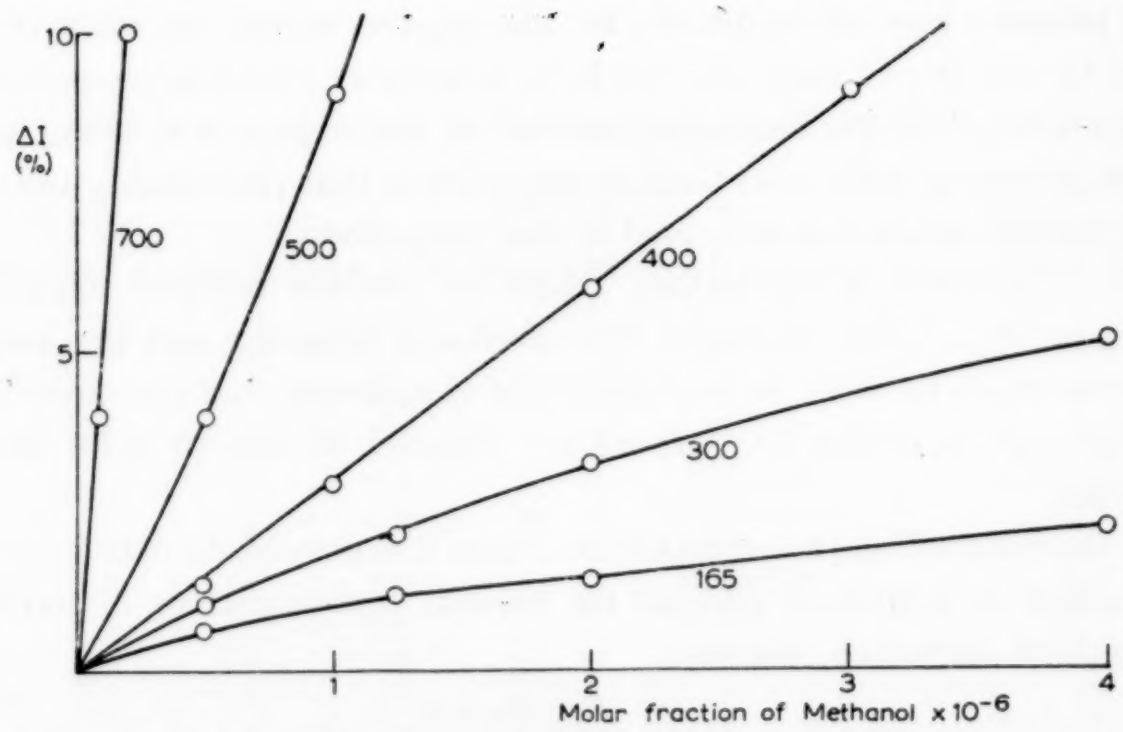


Fig. 2. The increase in ionisation current (ΔI) when argon containing various concentrations of methanol is introduced into the detector. The lines shown are drawn for various applied potentials the values of which are shown against each line in the figure.

References p. 46.

have enough kinetic energy to excite further argon atoms to the metastable state. The ionisation potential of argon is 15.7 ev, the excitation potential of metastable argon is 11.6 ev, this considerable difference allows a great increase in the concentration of metastable atoms without a corresponding increase in the concentration of ions. This is illustrated in Fig. 3 which shows the ionisation current in the detector

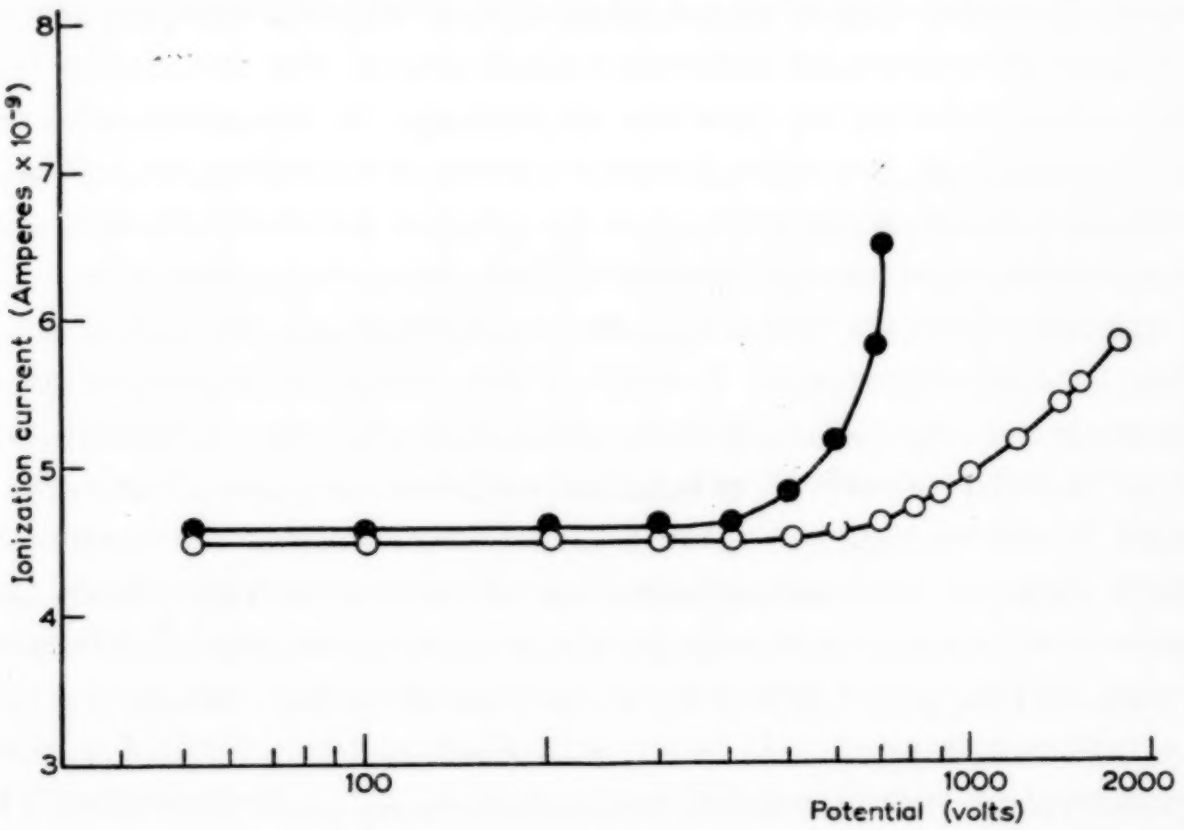


Fig. 3. The ionisation current in pure argon (○) and in argon containing pentanol (●). The pentanol concentration was one part in 10^6 by volume.

with pure argon flowing and with argon containing pentanol vapour at potentials between 50 and 1200 volts. In the pure argon the ionisation current is practically unchanged until the highest voltage is reached. Here the free electrons have sufficient energy to produce ions on collision. In the impure argon the ionisation current commences to rise at 300 volts and tends to infinity at 1100 where sparking occurs. The difference between the ionisation current in the impure and in the pure argon is 100 times greater at 1000 volts than at 300 volts so that presumably the concentration of metastable atoms has increased in this proportion.

The multiplication of metastable atoms by electron collision explains the increased sensitivity at high voltages. The improved linearity and the instability at very high potentials can also be explained if it is assumed that the electrons set free when foreign gas molecules are ionized are themselves free to enter the chain of multiplication.

Using the STERN-VOLMER equation as a basis it is possible to derive an expression for the increase in ionisation current for various concentrations of foreign gas at different applied potentials, namely:

$$\Delta I = \frac{K_i C\,(\Phi x + y)}{K_i C\,(1 - \Phi) + K_d} \qquad (2)$$

where x is the concentration of ions when $C = 0$, Φ is the multiplication factor for

References p. 46.

the concentration of metastable argon atoms. The other quantities are the same as those described for equation (1).

This relationship for different values of Φ corresponding to different applied

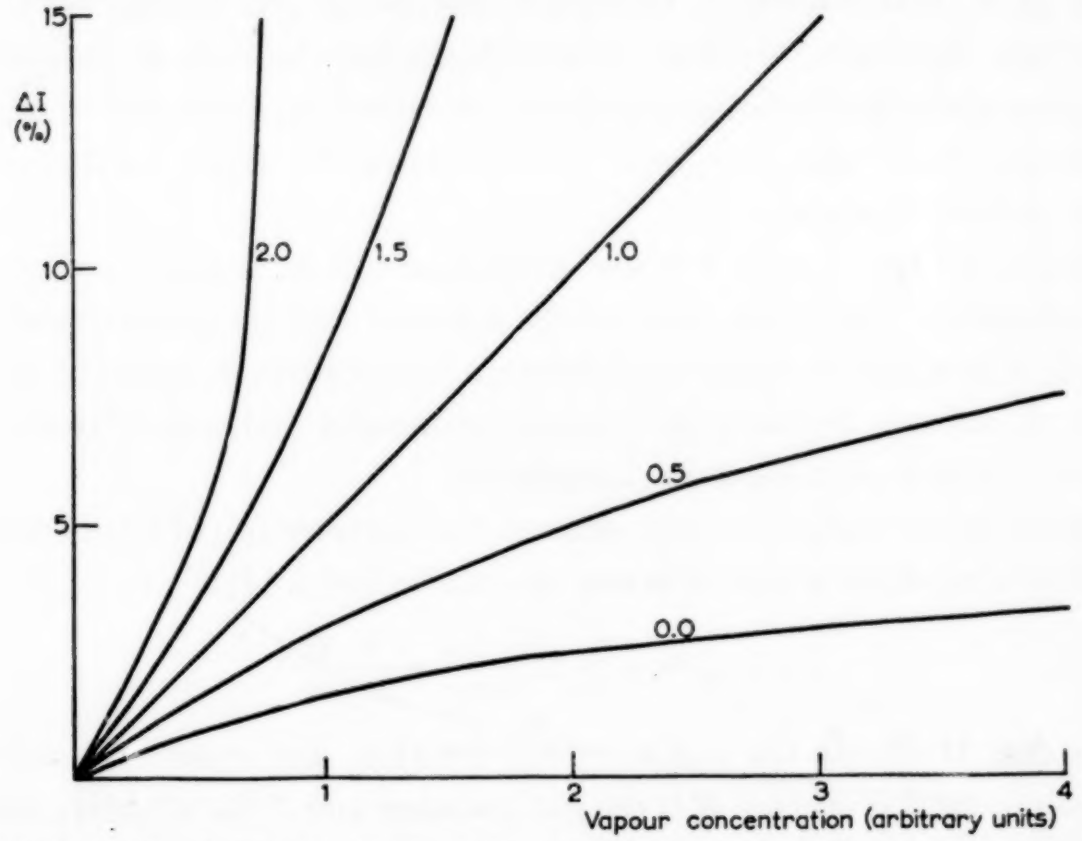


Fig. 4. The calculated increase in ionisation current (ΔI) when argon containing various concentrations of vapour is introduced into the detector. The lines are drawn for different values of the multiplication factor (Φ) of the initial concentration of excited argon atoms.

voltages is shown in Fig. 4 and can be seen to be closely similar to the observed response at different voltages shown in Fig. 2.

Response to various molecular species

One of the more important features of a practical detector is that it should regard the different molecular species presented to it either equally or in a simple predictable manner.

The response of the detector here described for different substances might be

TABLE I

THE SENSITIVITY OF THE DETECTOR TO COMPOUNDS WITH DIFFERENT IONISATION POTENTIALS

Compounds with ionisation potentials below 11.6 eV			*Compounds with ionisation potentials above 11.6 eV*		
Compound	*I.P. eV*	*S*	*Compound*	*I.P. eV*	*S*
Methanol	10.9	0.9	Nitrogen	15.5	0.00
Ethanol	10.6	0.9	Carbon dioxide	14.4	0.01
Hexane	10.6	1.2	Oxygen	13.6	0.00
Ethyl acetate	10.0	0.9	Methane	13.2	0.07
Benzene	9.5	1.5	Water	12.8	0.03
Bromobenzene	9.4	0.9			
Cyclohexane	9.2	1.4			

I.P. = ionisation potential in electron volts, S = molar sensitivity of the detector relative to pentanol ($S = 1$). Excitation potential of metastable argon atoms 11.6 electron volts.

References p. 46.

expected to be a function of, the ionisation potential, the cross sectional area, and the velocity of approach for the collision between the test molecules and the metastable argon atoms. Table I shows the sensitivity of the device for the same molar fractions of a series of substances whose ionisation potentials are known with precision, MORRISON AND NICHOLSON[12]. The Table illustrates that those substances with ionisation potentials markedly greater than the excitation potential of argon do not respond whereas those with ionisation near of below the argon excitation potential give closely similar responses.

In practice all but a very few low molecular weight organic compounds have ionisation potentials lower than 11.6 ev. An attempt was therefore made to account for the small differences in response of different compounds in terms of the expected frequencies of collision between the organic molecules and argon atoms using the kinetic theory of gases as a basis for calculation.

According to the kinetic theory of gases the number of collisions per second in a gas which is a mixture of two different molecular species is:

$$(r_1 + r_2)^2 n_1 n_2 \left\{3\,RT\left(\frac{1}{M_1} + \frac{1}{M_2}\right)\right\}^{1/2} \tag{3}$$

where r, n and M denote the radius, molar fraction, and molecular weight respectively of each molecular species. R is the gas constant and T the absolute temperature.

If the ionisation current in the detector is related to the frequency of collision between argon atoms and the foreign vapour molecules, then the relative response to different molecular species at the same molecular concentrations will be proportional to:

$$(r_A + r_x)^2 \left(\frac{1}{M_A} + \frac{1}{M_x}\right)^{1/2} \tag{4}$$

where r_A and M_A and r_x and M_x refer to the radius and molecular weights of argon and the test substance respectively.

For substances with molecular weights considerably greater than argon, and assuming that the radius of the molecules is approximately proportional to $M^{2/3}$ this expression reduces approximately to: $\frac{1}{M^{1/6}}$ (5)

This last expression would suggest that only small changes in the sensitivity of the detector for different compounds are to be expected. The mass sensitivity, that is the response to a given mass of substance, is the more convenient practical unit and is obtained from expressions (4) and (5) by dividing by the molecular weight. The observed mass sensitivities of different classes of organic compound plotted against their molecular weights are shown in Fig. 5; also shown as a solid line is the expected mass sensitivity using expression (4). In the calculations the radii of the molecules were assumed to be approximately equal to:

$$\left(\frac{3M}{4d}\right)^{1/3}$$

where (M) is the molecular weight and (d) the density in the liquid or solid state at low temperatures. Nearly all of the compounds whose mass sensitivities are shown

References p. 46.

in Fig. 5 have low temperature densities close to 1, and this value was chosen in calculating the expected response. Both the observed and the calculated sensitivities are referred to that of a standard substance 1-pentanol. Fig. 5 illustrates that with low molecular weight compounds there is good agreement between observation and theory. For the higher molecular weight alcohols and fatty acid esters the sensitivity falls less rapidly than the expression predicts. This divergence might

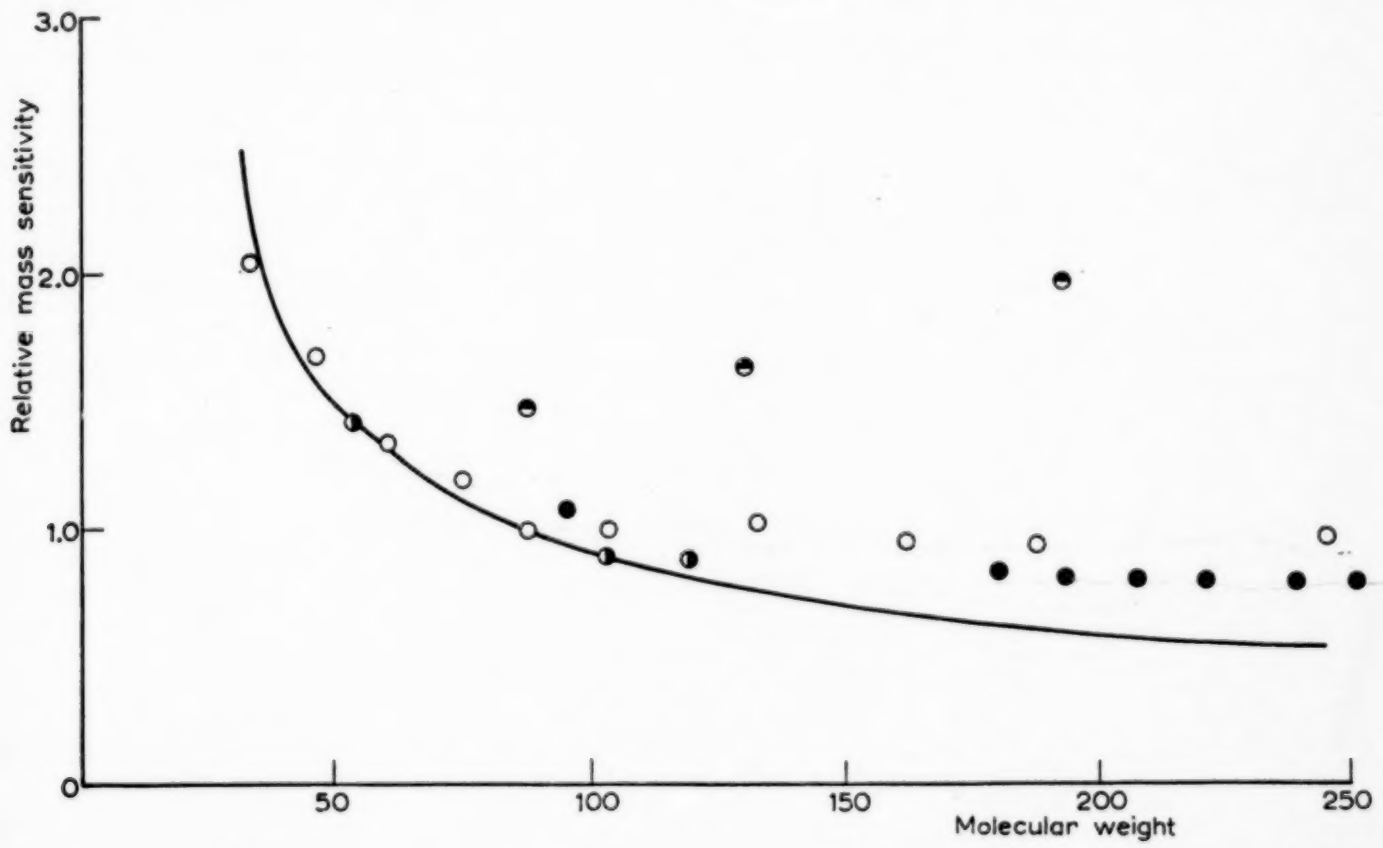


Fig. 5. The mass sensitivity of the detector to different organic substances. The solid line is the calculated mass sensitivity, and the points are the observed values for various classes of organic compounds as follows:
(○) *n*-primary alcohols (◑) ketones and ethers
(●) *n*-primary fatty acid methyl esters (◒) aromatic hydrocarbons.
Both the observed and calculated values of the mass sensitivity are relative to 1-pentanol, mass sensitivity 1.

be due to the partial or complete uncoiling of their hydrocarbon chains in the gas phase, so that the molecular radii are greater in the gas phase than in the liquid or solid state. Even greater divergences are shown by the aromatic hydrocarbons, benzene, naphthalene and phenanthrene. With these planar molecules the discrepancy is probably attributable to their large effective cross section when free to rotate in the gas phase. If in expression (4) the calculated sensitivities are determined from the cross sections of molecular models a much closer agreement between theory and practice is obtained. In general the detector does not discriminate between the different molecular species. With the methyl esters of the higher fatty acids and the alcohols, which compounds are most conveniently analysed by gas chromatography, the mass sensitivity is constant within the limits of precision of the method.

References p. 46.

PERFORMANCE

Sensitivity

The sensitivity of any electrical transducer is a function of the signal to noise ratio at given input level and to its time of response. With the detector here described the response time was determined by the requirements of resolution in gas chromatography and was set at 2 seconds, this was done by choosing appropriate values in the input circuit of the amplifier. At this time of response the random fluctuations

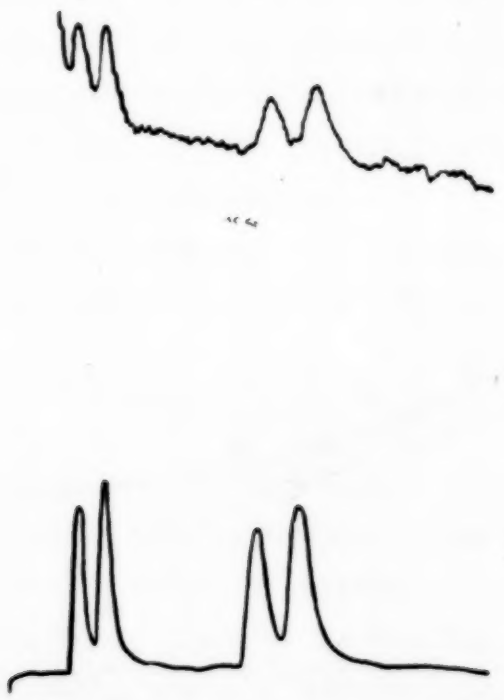


Fig. 6. A chromatogram illustrating the separation of a mixture of isomeric ethyl diphenyls. In the upper chromatogram the quantity of each component was 0.05 microgram and in the lower chromatogram 5.0 microgram.

in the current flow in the ionisation chamber was 0.05 % of the total current and this high level of noise is a consequence of the stochastic nature of the emission of the radio-active source. The sensitivity of the detector is therefore the concentration of vapour which would increase the ionisation current by 0.1 %, that is twice the noise level. Fig. 6 shows a record of a chromatogram taken with the detector operating at its highest sensitivity with an applied potential of 1200 volts. 0.05 microgram each of a mixture of isomeric ethyl-diphenyls (dissolved in 200 millimicrolitres of chlorobenzene) were added to the chromatography column and a separation made at 200°. The record illustrates the random fluctuations of the signal and the responses to the components of the mixture. The maximum deflection given by each component is approximately 20 times the noise level. At this sensitivity level therefore $5 \cdot 10^{-9}$ g of organic substance could just be detected. There is of course a considerable dilution of the vapour in the retention volume of the column; with the separation illustrated in Fig. 6 the sensitivity of the detector itself is rather more than ten times greater than that of the complete chromatographic apparatus. It would just respond to $5 \cdot 10^{-10}$ g or $2.5 \cdot 10^{-12}$ moles. There is good reason to believe that sensitivities considerably higher than this could be obtained if care were taken in the design of the detector to avoid sharp points and edges.

References p. 46.

It is rarely necessary or desirable to operate the detector at these extreme sensitivities and with operation at 400 volts, loads of between 10 micrograms and 1.0 mg give satisfactory results. For example in Fig. 6 there is also shown a record of the separation of the same mixture of diphenyls using an applied potential of 400 volts and a column load of 20 micrograms.

Stability and linearity of response

In normal use the amplifier gain is adjusted to a level at which the noise generated by the detector cannot be seen on the recorder tracing. At this level of amplification the maximum deflection of the recorder is given by an input signal of between two and five volts. This is high compared with that of most electrical transducers and no trace of instability or of long term drift attributable to the amplifier was expected or found. The ionisation current in the detector itself remains constant during small changes in the ambient temperature and pressure, and no special precautions, such as enclosing the detector in a thermostatically controlled environment, appear to be necessary. Ionisation devices similar to the detector form the basis of highly sensitive flowmeters, LOVELOCK AND WASILEWSKA[13], the detector was however designed to have a low sensitivity to gas flow rate; in practice alterations in the gas flow rate between 5 and 100 ml per minute did not sensibly affect the ionisation current.

Fig. 2 illustrates that the response of the instrument is linear over a considerable range of methanol vapour concentration, provided that the applied voltage is sufficient to provide some multiplication of the metastable argon atoms. The non-linearity at high voltages can be prevented by including a high resistance, 10^{10} ohms in series with the ionisation chamber. With some substances particularly low molecular weight halogenated hydrocarbons, for example CCl_4 and $CHCl_3$, the response becomes non-linear at high concentrations even when the applied voltage is sufficient for a linear response with most other compounds. This effect is probably a consequence of electron capture by these vapours. For the same reasons it is important to ensure that no air leaks into the detector during its operation; oxygen is particularly effective in capturing electrons and prevents the multiplication of the metastable argon atoms.

Although in the interests of linearity of response it is best to operate the detector at low vapour concentrations no "poisoning" of the detector or memory effects following the use of a gross excess of any compound have been observed.

Decomposition in the detector

With this and other ionisation devices the ionisation of any organic vapour molecule passing through the detector is inevitably followed by its destruction. The proportion of molecules destroyed by ionisation is closely related to the observed increase in ionisation current, since the detector operates under conditions where almost all ions produced in the chamber are collected. If it is assumed that not more than ten times as many molecules are damaged by radiation as are ionised, and this estimate is likely to include a large factor of safety, then the fraction of a gram mol-

References p. 46.

ecule destroyed per second is $A/M \times 10/96{,}500$ where A is the observed increase in ionisation current in amperes and M the molecular weight of the compound. Simple calculation indicates that the proportion of molecules destroyed varies from one in 10^6 at the maximum sensitivity to one in 10^9 under normal conditions of operation. Losses of this magnitude are clearly negligible. With other ionisation devices where much higher currents flow the complete destruction of the sample is possible.

Operation at high temperatures

Within the limits of the thermal stability of the materials of its construction the only effects of high temperatures on the operation of the detector is a small decrease in the ionisation current. The detector has been maintained for many months at 200° and for several days at 245° without appreciable change in its response. The small and regular change in ionisation current with temperature makes possible the continuous alterations in temperature during the course of a chromatographic separation.

ACKNOWLEDGEMENTS

I am indebted to Dr. A. T. JAMES for drawing my attention to the need for the device and for his helpful suggestions concerning the application of the detector to gas chromatography. I am most grateful to Mr. E. A. PIPER and to Mr. L. WOODGET, both of the Instrument Division of the National Institute for Medical Research, who constructed the detector and other apparatus ancillary to it.

SUMMARY

The unique ionisation properties of argon form the basis of a sensitive and stable detector for use with gas chromatography apparatus The detector is capable of responding to as little as $2 \cdot 10^{-12}$ moles of most organic compounds and its response to different molecular species is closely similar, and linear with concentration over a considerable range.

Details of construction and performance are given. The theory of operation of the device is dicussed, and depends on ionising collision between excited argon atoms and molecules of the test substance in the vapour phase.

REFERENCES

1 A. T. JAMES, in *Vapour Phase Chromatography*, edited by D. H. DESTY AND C. L. A. HARBOURN, Butterworth, London, 1957.
2 R. P. W. SCOTT, *ibid.*, *idem*.
3 C. H. DEAL, J. W. OTVOS, V. N. SMITH AND P. S. ZUCCO, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1958.
4 A. J. P. MARTIN AND A. T. JAMES, *Biochem. J.*, 63 (1956) 138.
5 J. HARLEY AND V. PRETORIUS, *Nature*, 178 (1956) 1244.
6 S. A. RYCE AND W. A. BRYCE, *Nature*, 179 (1957) 541.
7 M. G. SCROGGIE, *Wireless World*, 58 (1952) 14.
8 W. L. WELLMAN AND J. E. LOVELOCK, *J. Inst. Hearing & Ventilating Eng.*, 22 (1955) 421.
9 W. P. JESSE AND J. SADAUSKIS, *Phys. Rev.*, 100 (1955) 1755.
10 O. STERN AND M. VOLMER, *Physik. Z.*, 20 (1919) 183.
11 J. S. TOWNSEND, *Electrons in Gases*, Hutchinson, London, 1947.
12 J. D. MORRISON AND A. J. C. NICHOLSON, *J. Chem. Phys.*, 20 (1952) 1021.
13 J. E. LOVELOCK AND E. M. WASILEWSKA, *J. Sci. Instrum.*, 26 (1949) 367.

Received October 31st, 1957

CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOUR OF BORATES AND THEIR HETEROPOLYACIDS

M. J. NUNES DA COSTA AND R. A. GUEDES DE CARVALHO
Porto (Portugal)

INTRODUCTION

Paper chromatography has proved successful for the separation of inorganic polyacids such as polyphosphates or silicates. It was thus decided to investigate whether separations of the various borates (meta-, tetra- and perborates) were possible by paper chromatography. Our results described in Part I of this paper indicate that no chromatographic distinction between the various borates could be observed probably owing to their ready interconversion to the stablest ionic form under given conditions. Even additions of *cis*-dihydroxy compounds (except for high concentrations of tartaric acid) did not influence the R_F values of borates indicating that its movement is most likely already determined by a complexation equilibrium with the cellulose surface.

On the other hand the R_F values of borates mixed with inorganic acids known to form heteropolyacids are not the same as those of pure borate indicating that complex formation does take place and is sufficient to change the partition equilibria of the borate. Part II of this paper describes our results with borate–tungstate and borate–molybdate mixtures.

Throughout this work the ascending technique of development was used with Whatman No. 1 paper which was washed free of impurities with HCl before use.

PART I. – CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOUR OF BORATES

We determined the R_F values of aqueous saturated solutions of H_3BO_3, $Na_2B_4O_7.10H_2O$ and $NaBO_3.4H_2O$ with many solvent mixtures as eluants. None of the solvents gave a separation of the three anions used: BO_3^{-3}, $B_4O_7^{-2}$ and BO_3^-. Table I shows the R_F values obtained.

The similar behaviour of the three compounds tried led us to suppose that they have the same anions in solution. This agrees with several authors[1,2] whose opinions are that in dilute solutions of borates only $H_2BO_3^-$ and BO_2^- exists, and the obtention of anion aggregates (isopolyacids) when borate solutions are progressively acidified are not to be expected.

The hydrolysis of the monoborate ion

$$BO_2^- + 2\,H_2O \rightleftharpoons H_3BO_3 + OH^-$$

can perhaps explain some of the figures obtained.

References p. 51.

In acid or neutral medium the reaction is displaced to the right and probably H_3BO_3 predominates (experiments 5 to 14) with high R_F values. In alkaline medium the reaction will be displaced to left and BO_2^- ions will predominate (experiments 15, 16, 17 (a) and 18 (a)) with lower R_F values.

In all these experiments R_F values seem to be only influenced by the acidity of the medium, the anions present not altering those values, so that complex ions formed by borates and these anions are not to be expected.

TABLE I

Experiment	*Eluant*	*Phases*	R_F	*Observations*
1	Water	1	0.87–0.90	
2	Pyridine	1	0.88	tails with borates
3	*n*-Butanol	1	Retention at the origin and tails until 0.85	
4	Aniline	1	Retention and light tails	
5	*n*-Butanol + water (1:1)	2	0.50–0.55	
6	*n*-Butanol + HCl,*N* (1:1)	2	0.53–0.57	
7	*n*-Butanol + HNO_3,*N* (1:1)	2	0.51–0.54	
8	*n*-Butanol + H_2SO_4,*N* (1:1)	2	0.51	
9	*n*-Butanol + HCH_3COO,*N* (1:1)	2	0.52–0.58	
10	*n*-Butanol + $HClO_4$,0.1*N* (1:1)	2	0.51–0.53	
11	*n*-Butanol + H_3PO_4,0.1*N* (1:1)	2	0.51–0.53	
12	*n*-Butanol + satd.salicylic acid (1:1)	2	0.47–0.48	
13	*n*-Butanol + satd.succinic acid (1:1)	2	0.51–0.52	
14	*n*-Butanol + satd.oxalic acid (1:1)	2	0.48–0.49	
15	*n*-Butanol + (NH_4OH + NH_4Cl) (1:1)	2	0.20–0.23	pH ~ 9
16	*n*-Butanol + NH_4OH (1:1)	2	0.10–0.12	
17 (a)	*n*-Butanol + (citric acid (10%) + NH_4OH) (1:1)	2	0.21–0.24	pH ~ 9
(b)	*n*-Butanol + citric acid (10%) (1:1)	2	0.48–0.52	
(c)	*n*-Butanol + citric acid (sat.) (1:1)	2	0.96	
18 (a)	*n*-Butanol + (tartaric acid (10%) + NH_4OH) (1:1)	2	0.18–0.20	pH ~ 9
(b)	*n*-Butanol + tartaric acid (10%) (1:1)	2	0.42–0.50	
(c)	*n*-Butanol + tartaric acid (20%) (1:1)	2	0.45–0.50 0.15–0.23	two spots are revealed
(d)	*n*-Butanol + tartaric acid (40%) (1:1)	2	0.47–0.50 0.22–0.33	two spots are revealed
(e)	*n*-Butanol + tartaric acid (60%) (1:1)	2	0.56–0.58 0.49 (tail)	two spots are revealed
(f)	*n*-Butanol + tartaric acid (80%) (1:1)	2	0.55–0.57 0.45–0.46	two spots are revealed
(g)	*n*-Butanol + tartaric acid (100%) (1:1)	2	0.58 0.49–0.51	two spots are revealed
19	*n*-Butanol + hexamethylenetetramine (16%) (1:1)	2	0.49	slight tails with borates
20	*n*-Butanol + mannitol (10%) (3:1)	2	0.48	slight tails with borates
21	*n*-Butanol + glucose (10%) (1:1)	2	0.48–0.50	slight tails with borates
22	*n*-Butanol + urea (50%) (3:1)	2	0.47	slight tails with borates
23	*n*-Butanol + tannic acid (25%) (4:1)	2	0.42	slight tails with borates
24	*n*-Butanol + diphenylamine (20:1)	1	origin retention and tails	
25 (a)	*n*-Butanol + glycerol (10:1)	1	origin retention and tails	
(b)	*n*-Butanol + glycerol + water (2:1:1)	2	0.42–0.53	
26 (a)	*n*-Butanol + phenol (100:6)	1	origin retention and tails	
(b)	*n*-Butanol + phenol + water (50:44:6)	2	0.42–0.46	
27 (a)	*n*-Butanol + aniline (5:1)	1	origin retention and tails	
(b)	*n*-Butanol + aniline + water (5:1:1)	1	0.53	

References p. 51.

As several complexes between borates and some amines, sugars, etc. are known, we investigated this in experiments 19 to 27. However no change of R_F values was observed; once again the behaviour was similar to that obtained with only *n*-butanol + water.

With all the eluants without water (experiments 24, 25 (a), 26 (a) and 27 (a)) only a slight tailing is observed.

With tartaric acid in concentrations over 10 %, two spots are observed: one in the aqueous zone and other in the alcoholic zone, the separation line of the two zones being clearly noted between the two spots (see Fig. 1). In this case a complexation

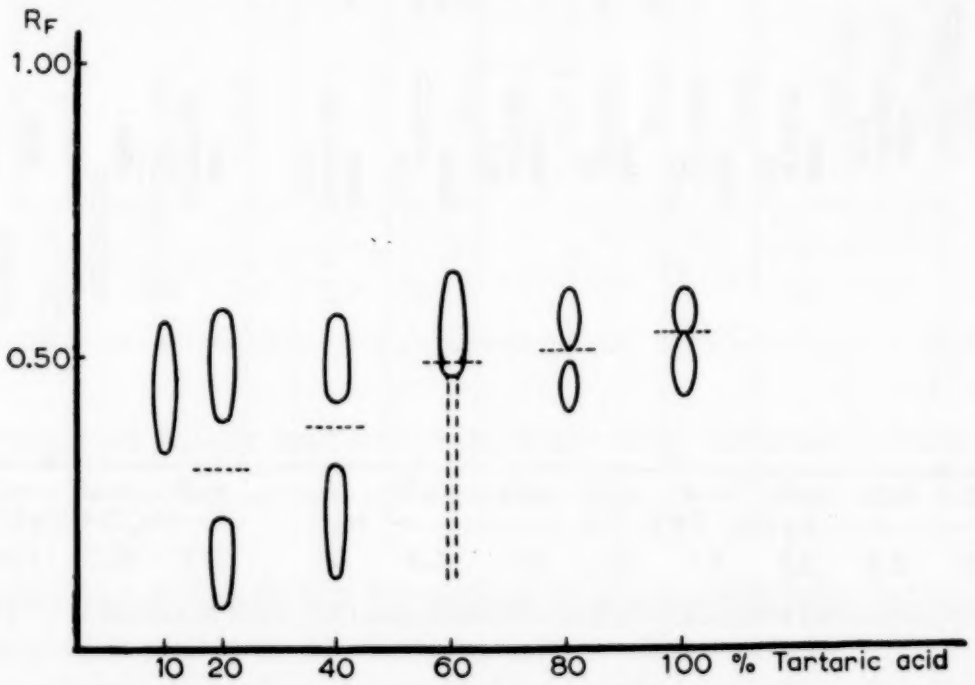


Fig. 1. Graphical results of experiments 18(b)–18(g).

seems to exist. In all cases the lower spot (aqueous zone) was much weaker than the upper one.

PART II. A – CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOUR OF BOROTUNGSTATES

We decided to study acid eluant mixtures of ketone and diluted sulphuric acid (1:1), because, among many kinds of eluants tried, those gave the highest R_F for tungstates. As alkaline eluants we used mixtures (1:1) of ketone and diluted ammonia.

In each experiment we chromatographed side by side four spots: one of H_3BO_3, one of Na_2WO_4 and two of a mixture of $H_3BO_3 + Na_2WO_4$. After development borate was detected in its isolated spot and in one of the mixed spots by an alcoholic solution of turmeric. Tungstate was detected in the other two spots by $SnCl_2$ solution. In this manner we detected the position of both borate and tungstate ions either isolated or in a mixture.

Two borate–tungstate mixtures with the following composition were used:

$$\frac{B_2O_3}{WO_3} = \frac{1}{1} \quad \text{and} \quad \frac{B_2O_3}{WO_3} = \frac{1}{12}$$

Two series of experiments were conducted with each one of the mixtures. The first series was in normal Whatman No. 1 paper, and the second in paper washed by

References p. 51.

acids. As the figures obtained in the four series were similar, we took in each case the mean of the four values determined. These values are graphically represented in Fig. 2.

Some inferences can be obtained from this figure:

(a) Spots of isolated borate have, essentially, the same R_F in the acid solvents. In the solvents of pH 9 to 11 the spots are longer and the R_F values decrease. For the

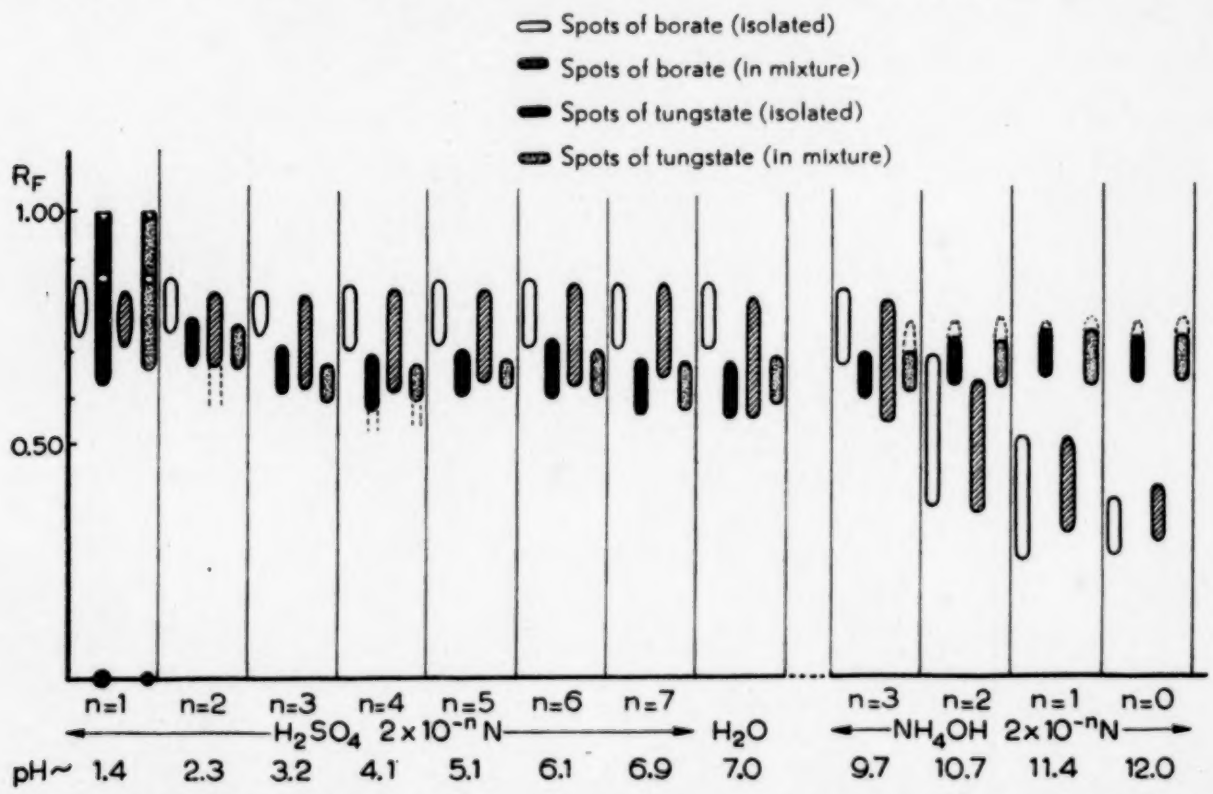


Fig. 2. Spots of borates and tungstates after chromatography with *n*-butanol + H_2SO_4 or NH_4OH.

zone of pH higher than 11 to 12 the spots became round again and the R_F remains low.

(b) Spots of tungstate (isolated or in mixture) present essentially the same R_F from pH 1 to 12. In the alkaline zone the spots show a tendency to give forward tails.

(c) Spots of borate in mixtures are longer than those of isolated borate and they comprise all the zone of isolated tungstate and borate spots. It seems that a retention of borate by tungstate exists from pH 1 to 10. With solutions of higher pH no retention occurs and the spots are perfectly separated.

If the observed retention is due to a borotungstic heteropolyacid, we can infer that that complex would be stable only in a zone of pH lower than 10, which is in agreement with the literature.

B – CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOUR OF BOROMOLYBDATES

In a similar study we obtained the results condensed in Fig. 3..

(a) A sharp decrease in the R_F values of molybdates with a pH increase can be observed. However at pH 9 the spots are already very elongated and for solutions of higher pH, the R_F increases and remains constant. The decrease of R_F values in the acid zone could be explained by the formation of distinct isopolymolybdates in different zones of pH, which is well known[3]. Further work is being done in order to clear up this point.

(b) We can see that in all the experiments borate is sharply retained by molybdate.

References p. 51.

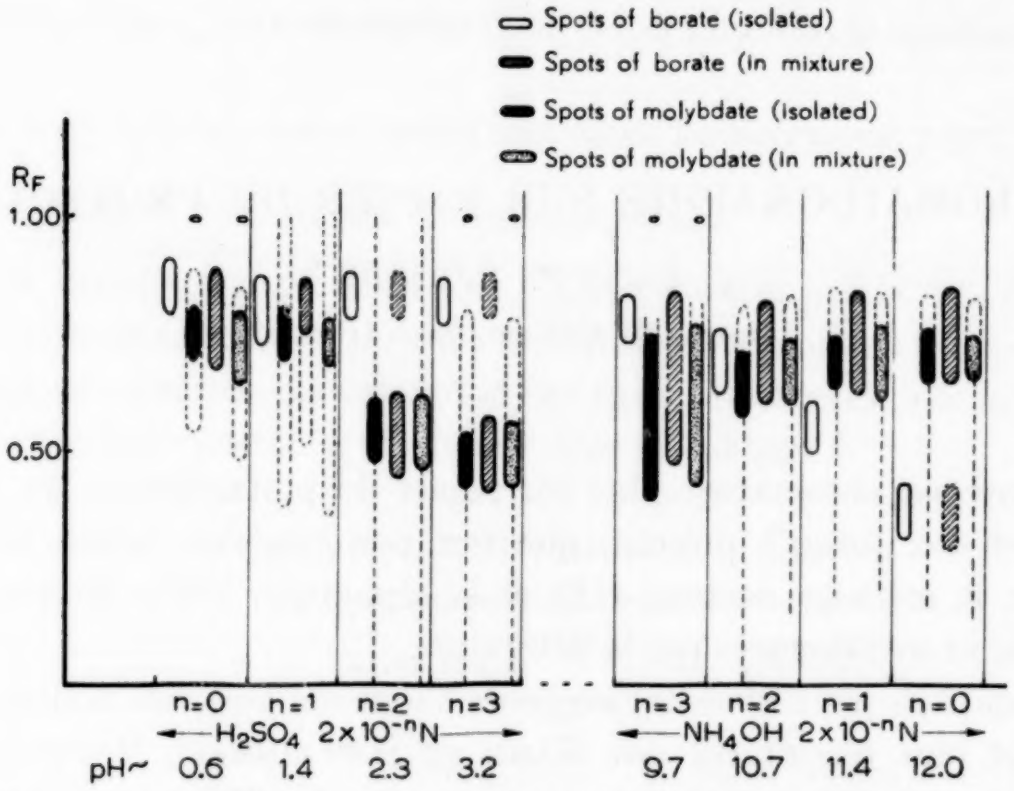


Fig. 3. Spots of borates and molybdates after chromatography with *n*-butanol + H_2SO_4 or NH_4OH.

When R_F values of borate and molybdate are very different (zones of pH 2 to 9 and 11) we observe a strong borate spot retained by molybdate and a weak spot of free borate.

(c) If this retention is due to the formation of a boromolybdic heteropolyacid, we see that the complex is stable in all the solutions studied, i.e., in a pH zone 0.6 to 12.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are indebted to "Centros de Estudos da Energia Nuclear" of the "Instituto de Alta Cultura" for financial aid to this work.

SUMMARY

R_F values of borates (meta-, tetra- and per-) are determined in a great number of solvents.

Chromatographic behaviour of borate–tungstate and borate–molybdate mixtures was studied using sulphuric acid solutions + ketone (1:1) and ammonia solutions + ketone (1:1) as solvents. R_F variations in function of pH of solvents are interpreted as being due to the formation of isopoly- and heteropolyacids.

REFERENCES

1 M. H. PICKARD, in R. E. KIRK AND D. F. OTHMER (Editors), *Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol. 2, New York, 1948, p. 606.
2 TH. MOELLER, *Inorganic Chemistry*, New York, 1952, p. 808.
3 L. F. AUDRIETH AND R. K. OSTERHELD, in R. E. KIRK AND D. F. OTHMER (Editors), *Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol. 7, New York, 1951, p. 461.

Received March 21st, 1957

LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DU PROTACTINIUM

JACQUES VERNOIS
Institut du Radium, Paris (France)

Les séparations par chromatographie sur papier du protactinium, du tantale et du niobium n'ont été, jusqu'à présent, que fort peu étudiées. Seules les séparations UX–UZ avec le mélange acétone–HF[1] et la séparation ^{233}Pa–Nb avec la méthyl-éthylcétone[2] sont mentionnées par la littérature.

Des séparations par résines échangeuses d'ions ont aussi été réalisées par KRAUS ET MOORE[3] et plus récemment par KAHN ET HAWKINSON[4], MADDOCK ET PUGH[5].

Dans ce travail, la séparation du protactinium des éléments qui l'accompagnent généralement dans les produits naturels, a été plus spécialement étudiée. (Une note préliminaire a été publiée[6].) Ces impuretés, principalement le tantale, le niobium, le zirconium, l'hafnium et le titane et d'autre part le fer, le bismuth et l'uranium étant particulièrement solubles dans HF, nous avons étudié des solvants contenant cet acide qui permet d'éviter l'hydrolyse de ces éléments.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Préparation des solutions fluorhydriques

Les solutions fluorhydriques ont été préparées à partir de produits très purs. Les solutions de tantale et de niobium étaient préparées à partir des pentoxydes Ta_2O_5 et Nb_2O_5. Ces oxydes étaient fondus avec du bisulfate de potassium en plaques dans un creuset en platine. La masse fondue était reprise par une solution diluée d'acide sulfurique et l'hydroxyde précipité par l'ammoniaque. Le produit, filtré et lavé sur entonnoir en polyéthylène jusqu'à neutralité, était dissout dans le minimum d'acide fluorhydrique concentré et dilué ensuite de manière à obtenir une solution finale à 1% d'acide fluorhydrique. Le même processus était répété pour les solutions de fer, d'uranium, de titane et de zirconium.

La solution fluorhydrique d'hafnium était préparée par dissolution directe du métal dans l'acide concentré. La solution chlorhydrique de ^{233}Pa était évaporée à sec au bain-marie sur une plaque de polyéthylène, reprise et évaporée plusieurs fois avec HF concentré de manière à éliminer totalement les ions chlorures et reprise finalement par HF à 1%.

Les solutions oxaliques de ^{95}Zr–^{95}Nb, utilisées comme indicateurs, étaient précipitées par l'ammoniaque en présence de fer servant de support et redissoutes en milieu HF.

Seule, la solution de bismuth, préparée à partier de l'oxyde contenait la quantité

Bibliographie p. 61.

d'acide chlorhydrique juste nécessaire pour éviter l'hydrolyse apparaissant en milieu HF 1%.

Toutes les solutions étaient conservées dans des flacons en polyéthylène.

Détection des éléments envisagés sur le chromatogramme

Les éléments inactifs étaient, dans tous les cas, révélés par la 8-hydroxyquinoléine en solution ammoniac–alcoolique, seuls le tantale et le niobium n'apparaissent qu'au bout de quelques minutes. La coloration des taches observées, à la lumière ordinaire et à la lumière ultra-violette, est indiquee dans le Tableau I.

TABLEAU I

COLORATION DES TACHES

	Lumière ordinaire	*Lumière ultra-violette*
Fe^{3+}	noir	pourpre
Hf^{4+}	jaune	jaune brillant
Zr^{4+}	jaune	jaune brillant
UO_2^{+}	orangé	noir
Ta^{5+}	jaune orangé	brun
Nb^{5+}	jaune	jaune brillant
Bi^{3+}	jaune	rouge
Ti^{4+}	jaune orangé	brun

^{233}Pa, ^{95}Zr et ^{95}Nb étaient détectés par leur rayonnement à l'aide d'un compteur cloche Geiger-Müller.

A ces fins, la bande de papier est déplacée de 0.5 cm en 0.5 cm et l'activité mesurée à chaque endroit. Si l'on porte les activités en fonction de la distance à partir de la tache de départ, on obtient une courbe définissant la répartition de l'activité le long de la bande de papier.

Mode opératoire

La présence d'HF dans les solvants utilisés exclut l'emploi de matériel en verre et, par suite, nous avons travaillé exclusivement avec du matériel en polyéthylène. Nous avons procédé par élution ascendante. Les dimensions des conserves dans lesquelles s'effectuaient les développements étaient les suivantes: diamètre 17 cm, hauteur 27 cm. Le cylindre était fermé durant la manipulation afin que l'atmosphère soit saturée de la vapeur du solvant déposé au fond du récipient.

Dans toutes nos expériences nous avons employé le papier Whatman No. 1 (pour chromatographie). La feuille de papier d'environ 22 × 22 cm était enroulée en cylindre et déposée sur le fond du récipient.

Les solutions étaient déposées sur le papier à l'aide d'une micropipette en polyéthylène. La durée des développements était de l'ordre d'une dizaine d'heures. Le chromatogramme était ensuite retiré et séché par ventilation sous sorbonne.

On procédait ensuite à la révélation des taches inactives et à la détection des radioéléments. Dans ce dernier cas, la bande était entourée de papier cellophane afin d'éviter les contaminations radioactives de l'appareil de mesure.

Bibliographie p. 61.

RÉSULTATS OBTENUS

Au cours de nos recherches, nous avons comparé les variations des valeurs de R_F avec les changements d'acidité chlorhydrique et fluorhydrique. Deux séries de manipulations ont par suite été effectuées. Nous avons, en premier lieu, fait varier la concentration en acide fluorhydrique, la concentration en acide chlorhydrique et en butanol était maintenue constante, et nous avons ensuite étudié les variations de R_F en fonction de la quantité d'acide chlorhydrique à concentration constante en HF et en butanol.

Influence de la concentration en HF sur les valeurs de R_F

La quantité d'HCl utilisée dans cette série de manipulations était de 25 ml d'HCl 12 *N* pour 100 ml de mélange. La concentration en butanol normal était égale à 50 ml et la concentration en acide fluorhydrique exprimée en ml d'HF 20 *N* était variable ainsi que corrélativement la quantité d'eau utilisée. Les résultats obtenus sont réunis dans le Tableau II.

TABLEAU II

VALEURS R_F À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS EN HF

HF	*0*	*1*	*5*	*10*	*15*	*20*	*25*
Fe	0.72	0.61	0.56	0.54	0.52	0.53	0.61
Ti	0.46	0.69	0.66	0.65	0.63	0.55	0.54
Bi	0.79	0.74	0.66	0.61	0.56	0.46	0.46
Nb		0.82	0.96	0.95	0.95	0.95	0.92
Ta		1	1	0.99	0.98	0.96	0.94
Zr	0.28 C	0.58 C	0.64 C	0.65 C	0.60 C	0.60 C	0.56 C
Hf	0.30	0.58	0.64	0.65	0.60	0.60	0.56
U	0.49	0.49	0.48	0.48	0.47	0.40	0.43
Pa	0.30	0.50	0.45	0.45	0.40	0.33	0.39

C signifie comète.

Les courbes R_F — f(concentration en HF) ont été tracées sur différentes figures afin de déterminer exactement les conditions optima de séparations.

La Fig. 1 représente les variations de R_F de la triade Pa–Ta–Nb. Les Figs. 2, 3 et 4 représentent respectivement les variations des valeurs de R_F des groupes Ti–Fe–Pa, Zr–Nb–Pa et Bi–U–Pa.

Influence de la concentration en HCl sur les valeurs de R_F

Dans cette seconde série de manipulations, nous avons fait varier la concentration en HCl, tout en maintenant la concentration en HF constante et égale à 1% (soit, par conséquent 1 ml d'HF 20 *N* pour 100 ml de mélange). La quantité de butanol utilisée restait égale à 50 ml.

Les valeurs de R_F obtenues sont réunies dans le Tableau III.

Les courbes R_F — f(concentration en HCl) sont représentées par les Figs. 5 et 6.

Les valeurs de R_F de quelques métaux obtenues sont très voisines de celles obtenues en milieu HCl exempt d'HF par LEDERER et DE CARVALHO[7,8]. Mais la présence d'acide fluorhydrique permet une meilleure solubilisation d'éléments tels que le Pa et on évite ainsi les phénomènes d'hydrolyse.

Bibliographie p. 61.

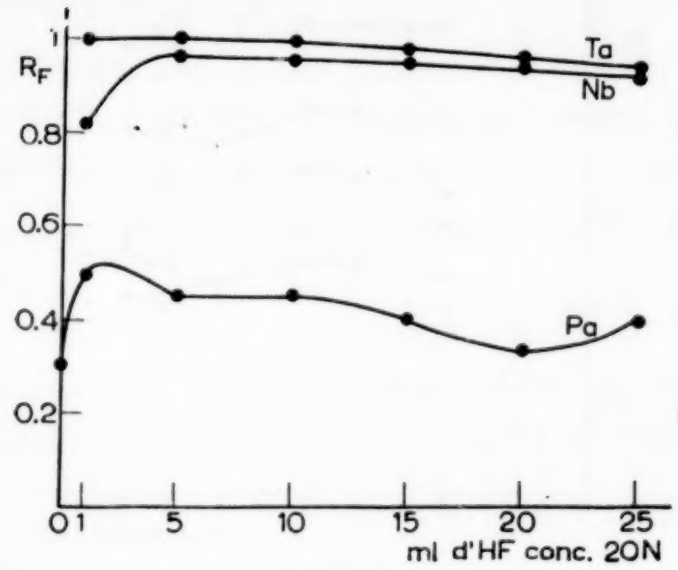


Fig. 1

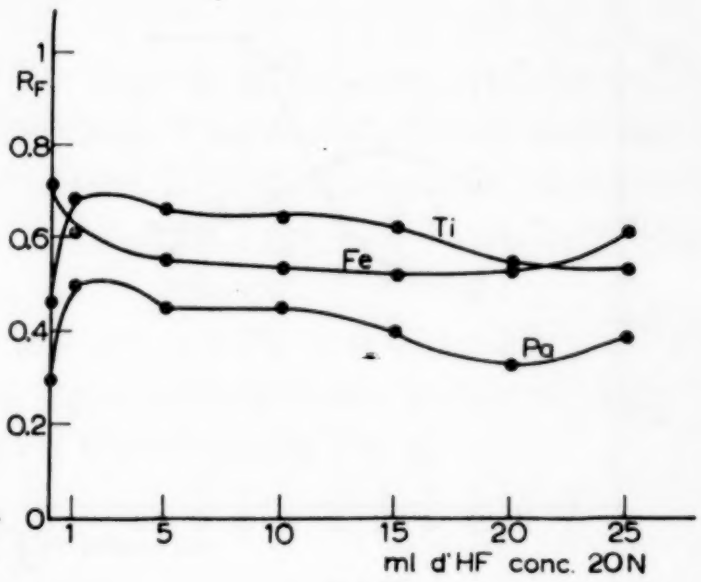


Fig. 2

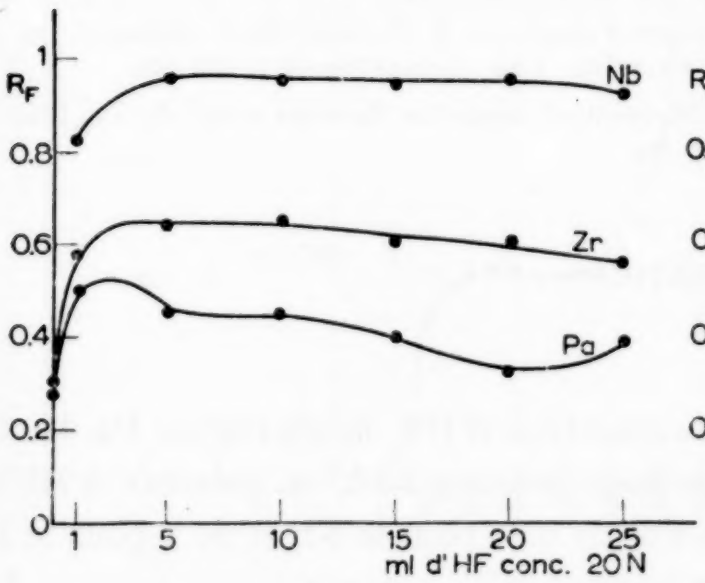


Fig. 3

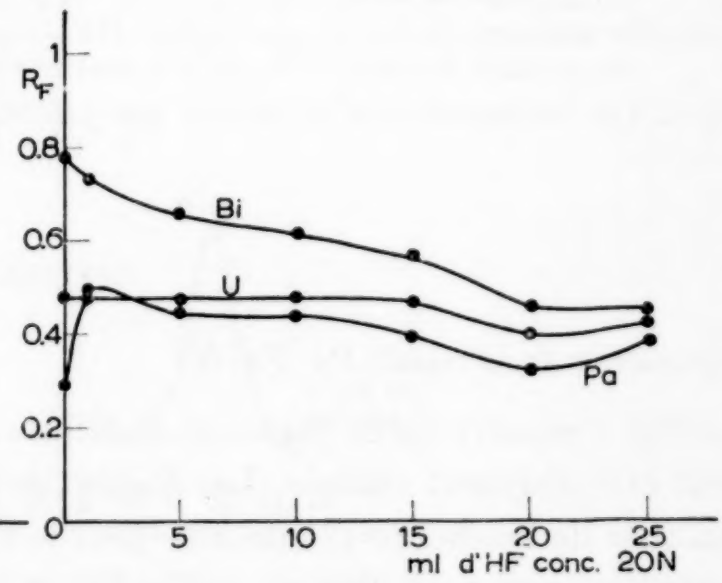


Fig. 4

Fig. 1. Variations des valeurs de R_F de Pa, Ta et Nb en fonction de la concentration en HF. Les concentrations des mélanges employés dans toute cette série de manipulations, étaient les suivantes: HCl: 25 ml d'acide 12 *N* Prolabo R.P. Butanol: 50 ml de produit Prolabo R.P. HF: quantité variable; les quantités d'HF sont exprimées en ml d'acide 20 *N* Prolabo R.P. Eau: complément à 100 ml.

Fig. 2. Variation des valeurs de R_F de Fe, Ti et Pa.

Fig. 3. Variation des valeurs de R_F de Zr, Nb et Pa.

Fig. 4. Variation des valeurs de R_F de U, Bi et Pa.

TABLEAU III

VALEURS R_F À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS EN HCl

HCl	*3*	*5*	*6*	*8*	*10*	
Pa	0.45	0.48	0.50	0.46	0.42	
Fe	0.48	0.52	0.61	1	1	
Bi	0.68	0.76	0.74	0.62	0.59	
Ta	1	1	1	0.96	0.96	
Nb	0.64	0.82	0.82	0.75	0.78	
Ti	0.57	0.67	0.69	0.67	0.56	
Zr	0.50	C	C	C	C	3 taches
Hf	0.50	0.62	C	C	C	
U	0.39	0.49	0.49	0.45	0.53	

C signifie comète.

Bibliographie p. 61.

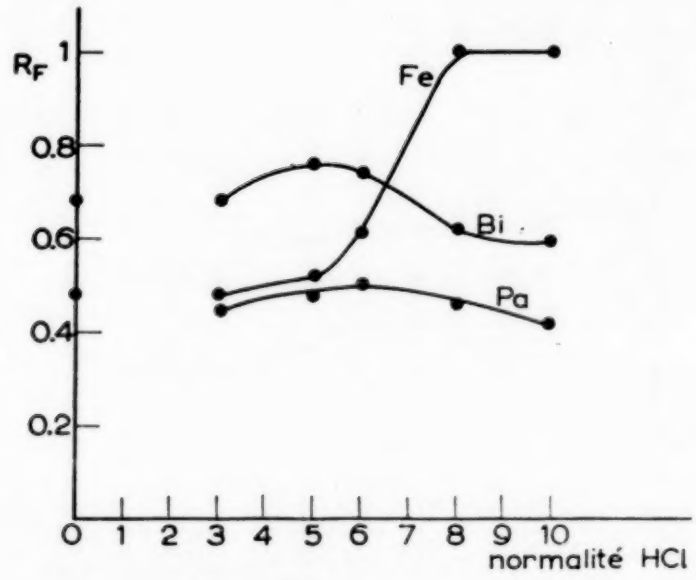


Fig. 5

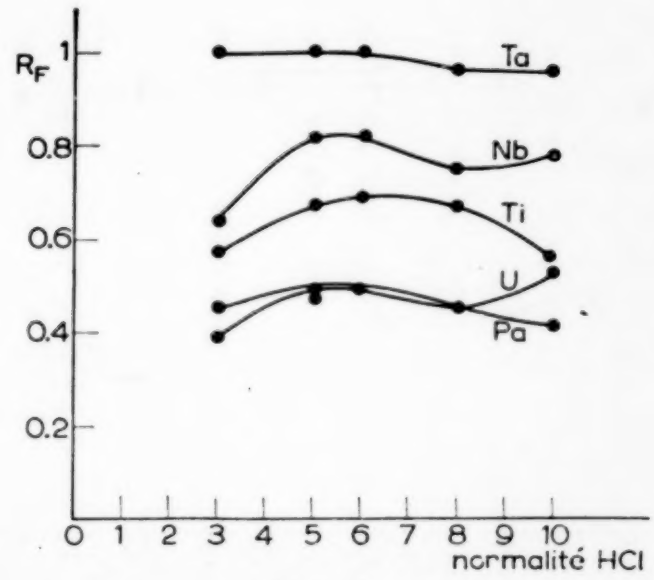


Fig. 6

Fig. 5. Variations des valeurs de R_F de Fe, Bi et Pa en fonction de la concentration en HCl. Les quantités utilisées étaient les suivantes: HF: 1 ml d'acide 20 *N* Prolabo R.P. Butanol: 50 ml de produit Prolabo R.P. HCl: quantité variable. Eau: complément à 100 ml.

Fig. 6. Les conditions sont les mêmes que précédemment, mais les R_F sont ceux de Ta, Nb, Ti, U et Pa.

APPLICATIONS

Séparation de la triade Pa–Ta–Nb

La Fig. 1 montre qu'en présence de faibles quantités d'HF, la séparation Pa–Ta–Nb peut être aisément réalisée. Les R_F de ces trois éléments sont, en présence d'HF en quantité de l'ordre de 1% de 0.50 pour le Pa, de 0.82 pour le Nb et de 1 pour le Ta. Cette séparation est illustrée par la Fig. 7.

La séparation Ta–Nb peut aussi avoir lieu en milieu HCl 3 *N* et HF 1% comme le montre la Fig. 8.

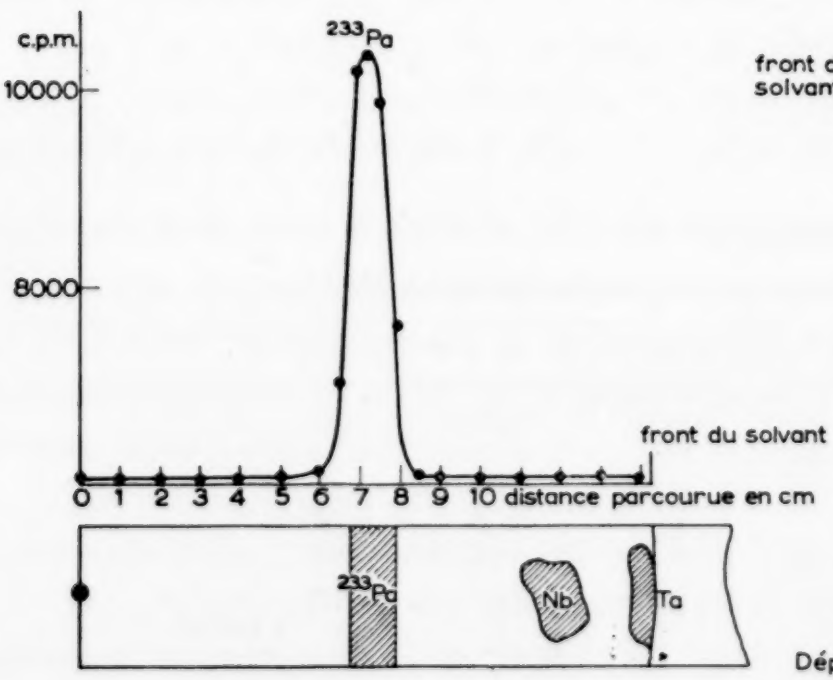


Fig. 7. Séparation Pa–Ta–Nb. HCl 12 *N*: 25 ml. Butanol: 50 ml. HF 20 *N* 1 ml. Eau: 24 ml.

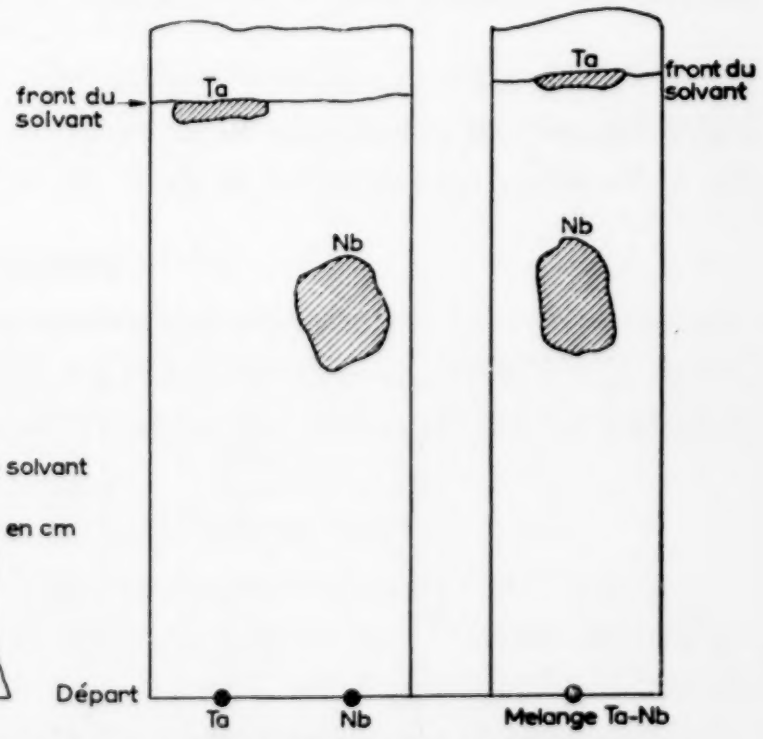


Fig. 8. Séparation Ta–Nb.

Bibliographie p. 61.

Séparation Zr–Nb

La séparation Zr–Nb présente un intérêt par suite de la présence, dans les produits de fission, de ^{95}Zr, radioélément qui est rapidement en équilibre avec son dérivé le ^{95}Nb. Lors de son utilisation en tant qu'indicateur, il est donc nécessaire de le purifier. Nous avons réalisé la séparation à l'aide du mélange HCl–HF–eau–butanol (25/1/24/50 ml).

^{95}Zr produit une comète s'étendant de $R_F = 0$ à $R_F = 0.56$ tandis que ^{95}Nb a un R_F égal à 0.82; la séparation de ces deux radioéléments s'effectue donc très facilement. Le résultat de cette opération est illustré par la Fig. 9.

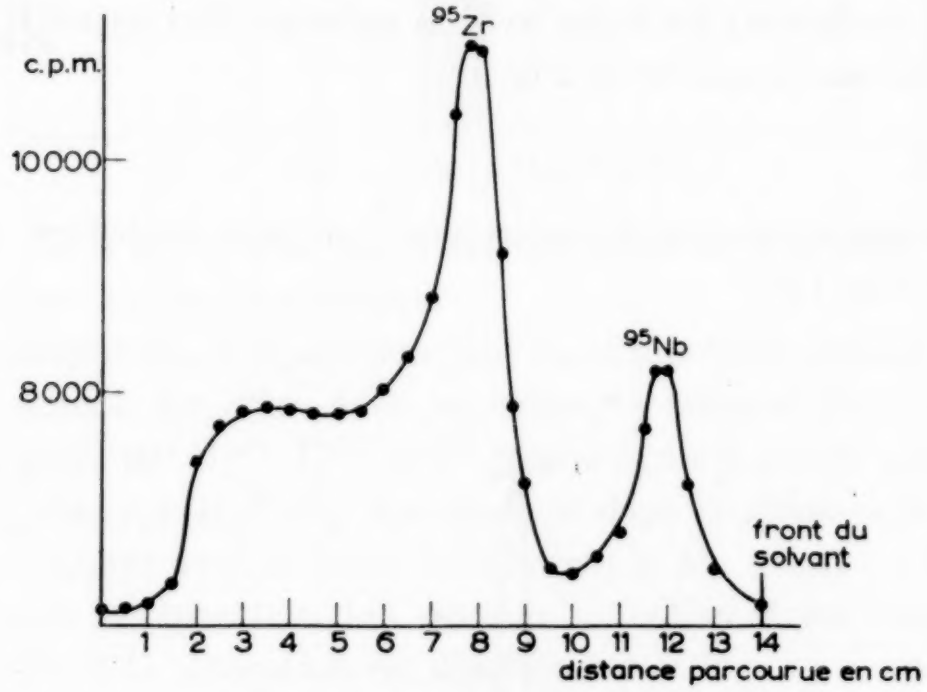


Fig. 9. Séparation ^{95}Zr–^{95}Nb.

La séparation ^{95}Zr–^{95}Nb peut encore être améliorée en augmentant la concentration en HF. Avec un mélange contenant 10% d'HF, le R_F du Nb est voisin de 0.92 et on obtient le résultat illustré par la Fig. 10.

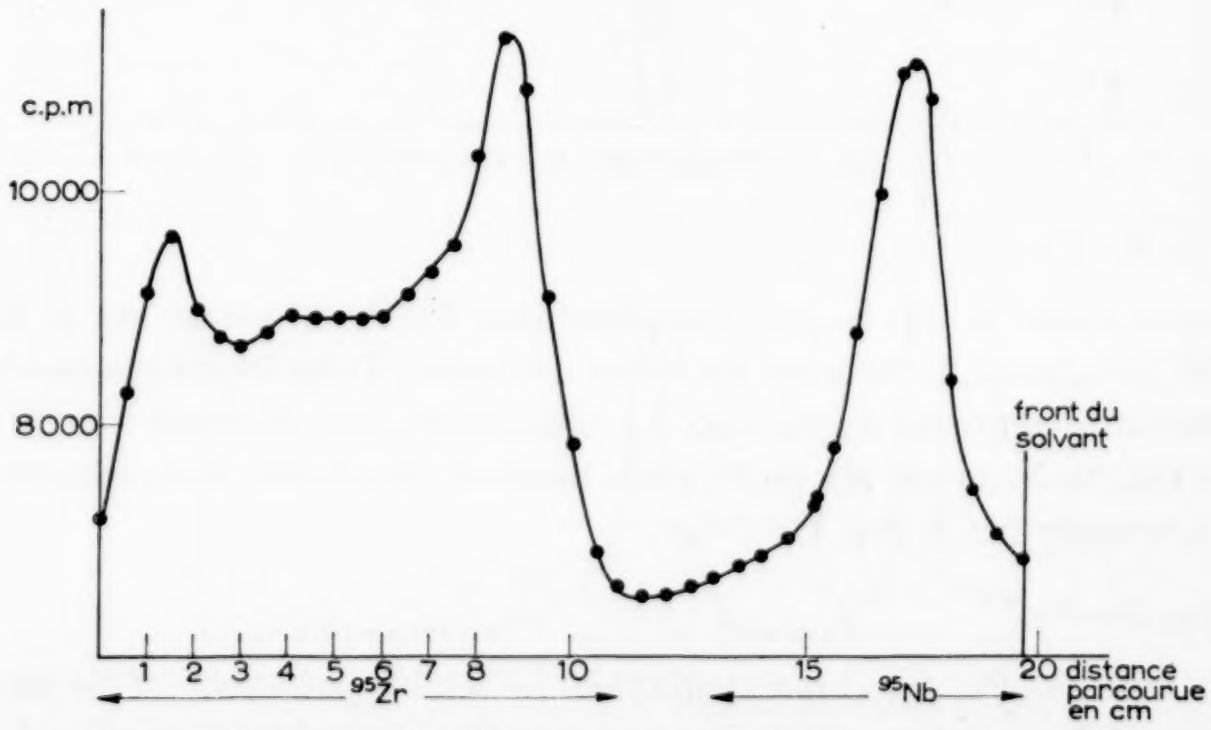


Fig. 10. Séparation ^{95}Zr–^{95}Nb avec concentration augmentée en HF.

Bibliographie p. 61.

Il est nécessaire de noter, dans ces deux derniers cas, que le R_F du Zr, à l'état de traces, est un peu inférieur à celui obtenu avec des quantités macroscopiques; d'une manière générale, dans ce type de solvant, le Zr donne des comètes. La Fig. 11 montre l'existence de deux pics dus probablement à la formation de plusieurs complexes fluorés migrant différemment.

Séparation Pa–Ti

La séparation Pa–Ti présente un interêt par suite de l'emploi du titane comme entraîneur du protactinium. Les propriétés chimiques de ces deux éléments étant très voisines, leur séparation, par les méthodes classiques, sont difficiles. Par chromatographie, on peut facilement les isoler avec le mélange HCl 25 ml/HF 5 ml/butanol 50ml/eau 20 ml comme le montre la Fig. 11.

Séparation Pa–Bi

Dans les mêmes conditions que précedemment, on peut facilement réaliser la séparation Bi–Pa (*cf.* Fig. 11).

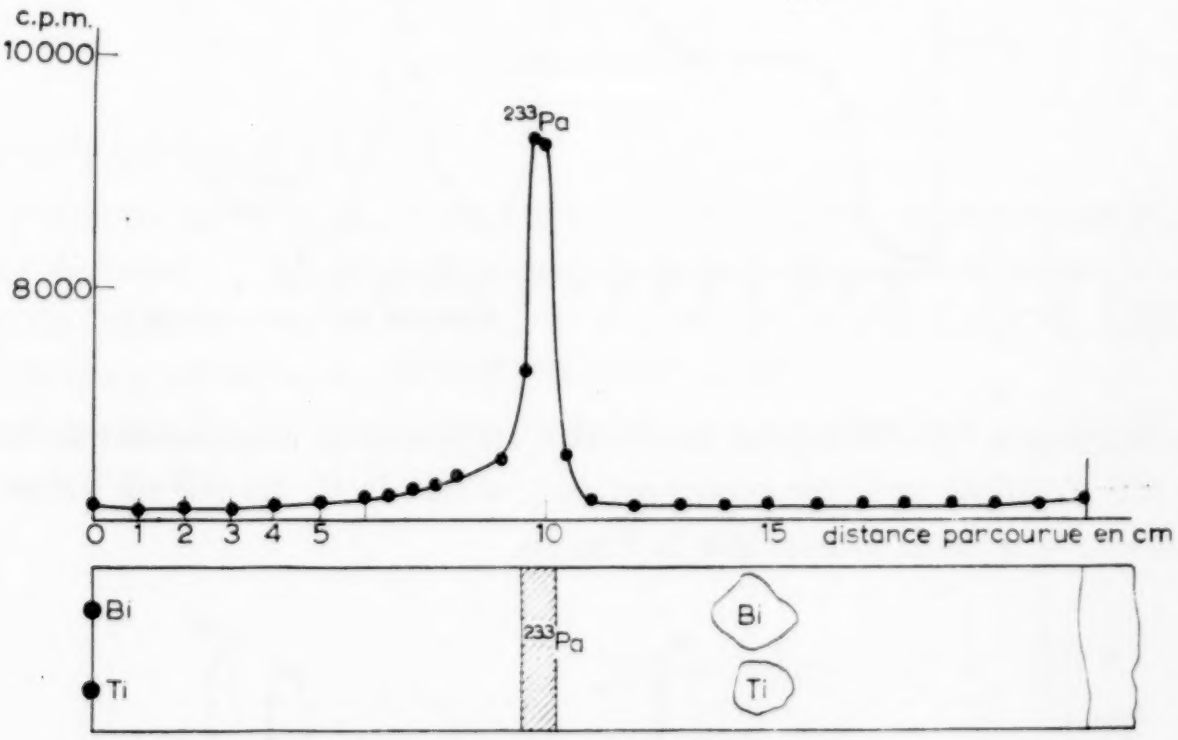


Fig. 11. Séparations Pa–Ti et Pa–Bi.

Séparation Fe–Pa

Nous avons réalisé la très importante séparation Fe–Pa en jouant sur le fait qu'en milieu HCl concentré, le fer a un R_F voisin de l'unité. Dans les mêmes conditions, le protactinium présente un R_F de 0.46. La séparation a été effectuée avec le mélange suivant: HCl 12 *N*, 33 ml; HF 20 *N*, 1 ml; butanol, 50 ml; eau, complément à 100 ml et est représentée par la Fig. 12.

Séparation Po–Pa

La séparation Po–Pa, par chromatographie, ne semble pas avoir été décrite dans la littérature. Elle peut être effectuée par extraction par solvant, comme il a été vu

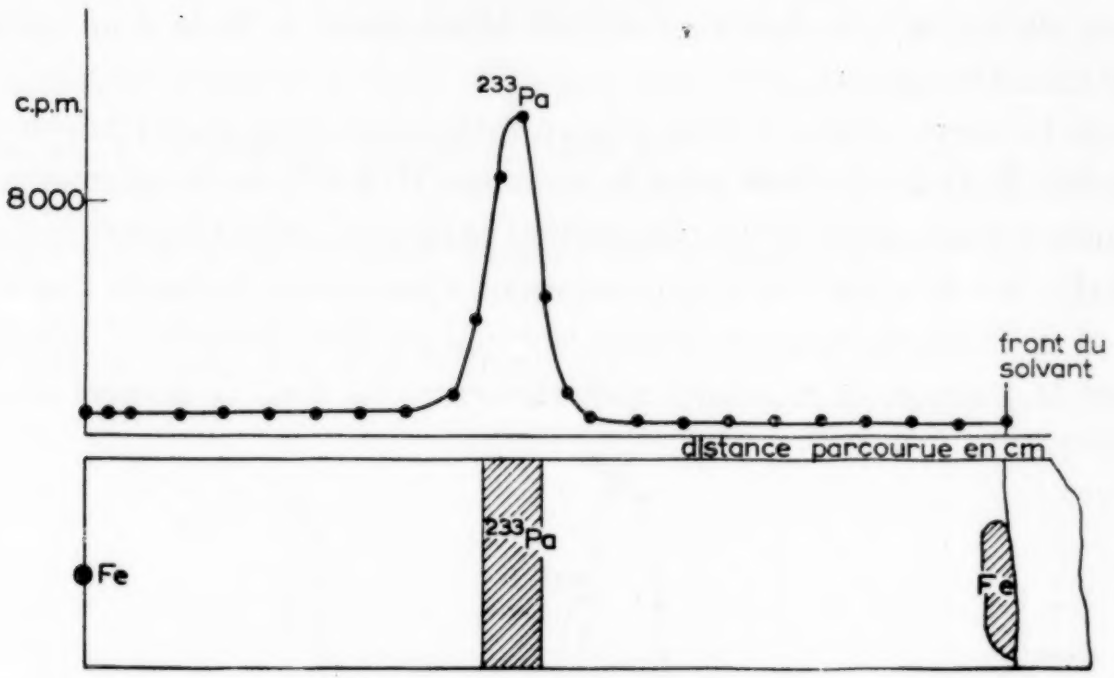


Fig. 12. Séparation Fe–Pa.

précedemment. Dans ce dernier cas, il est nécessaire de travailler en milieu HF et d'effectuer plusieurs cycles d'extraction.

Par chromatographie, la séparation peut facillement être réalisée avec un mélange HCl–HF–eau–butanol. En effet, dans les mélanges butanol–HCl, on trouve le Po^{IV} dans la même région que Hg^{II}, Tl^{III}, Au^{III} et cela incite à penser que le Po^{IV} forme un complexe chloré du type H_2PoCl_6, non dissocié dans la phase organique. Par suite cet élément doit migrer avec le front du solvant; le Pa, ayant un R_F moyen de 0.5 dans ces conditions la séparation doit pouvoir se réaliser. L'expérience a été réalisée avec ^{233}Pa et ^{210}Po et la séparation est illustrée par la Fig. 13. Le protactinium était mesuré par son rayonnement β au moyen des techniques exposées précedemment. Par contre, le polonium, par suite de la forte absorption des rayons α était mesuré en modifiant légèrement l'appareillage classique. La bande de papier était découpée

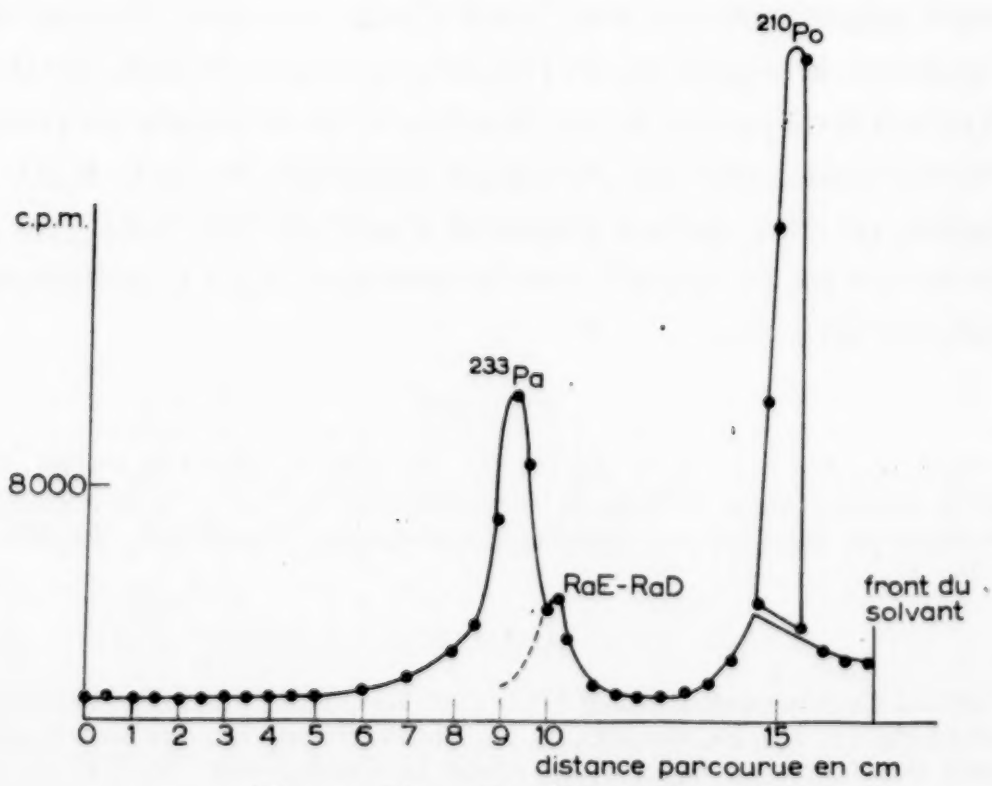


Fig. 13. Séparation ^{233}Pa–^{210}Po.

Bibliographie p. 61.

en tranches de 0.5 cm et chacune comptée séparément à l'aide d'un compteur α à fenêtre de mica très mince.

Lors de la même étude, il nous a paru intéressant d'examiner le comportement de l'ensemble RaD–RaE–RaF dans le mélange HCl–HF précedemment; l'activité a été mesurée 5 jours après le développement pour permettre l'accumulation du RaE dans le RaD. Sur la même bande, nous avons ajouté des quantités macroscopiques de plomb et de bismuth, respectivement isotopes du RaD et du RaE, afin de préciser exactement la position de ces deux radioéléments. La Fig. 14 montre la répartition

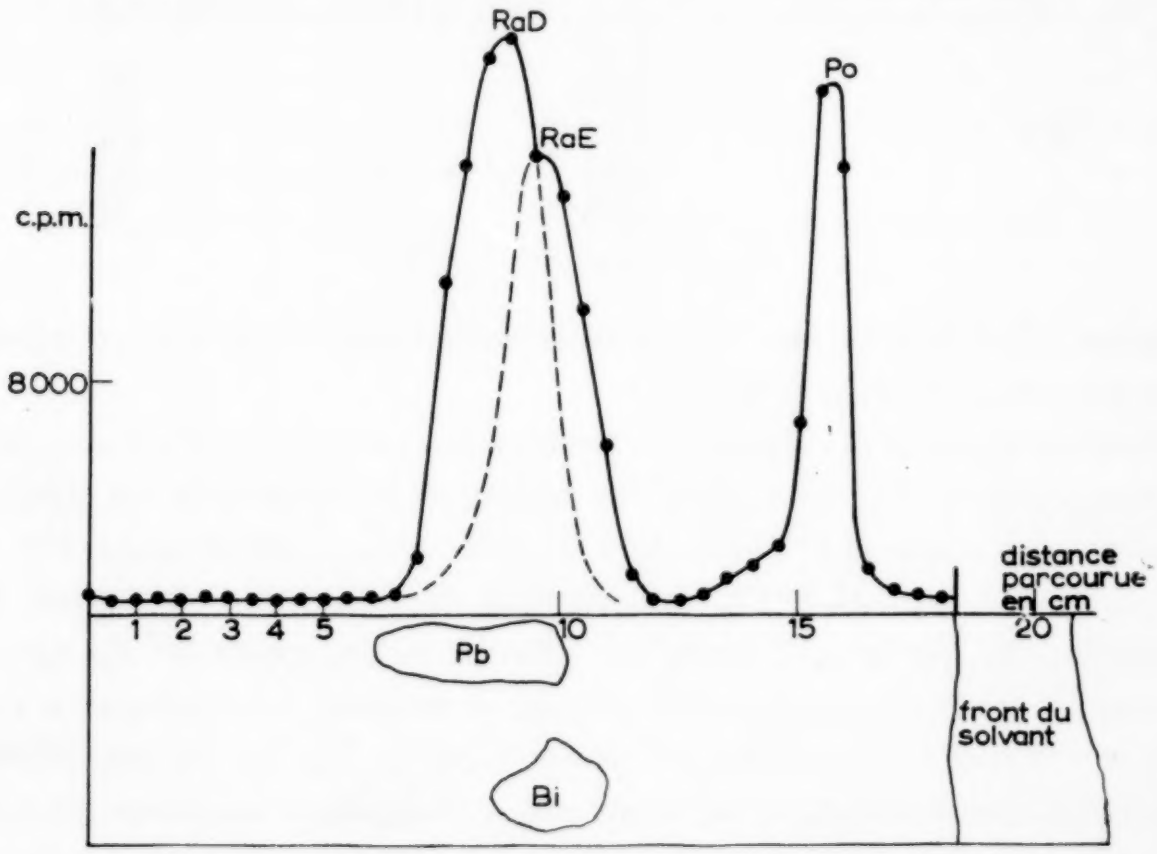


Fig. 14. Séparation du polonium du mélange RaE–RaD.

des activités sur la bande de papier. Par suite de la présence de grosses quantités d'HCl, le plomb migre suffisamment pour éliminer toutes chances de séparation RaE–RaD. Par contre la séparation du polonium du mélange RaE–RaD est facilement réalisable. Cette méthode permet la purification totale et rapide du polonium, celui-ci étant très souvent contaminé par de faibles quantités de RaE–RaD. L'examen de la Fig. 13 montre, en effet, qu'une impureté d'activité très faible, est présente. Son R_F, de l'ordre de 0.6 est en accord avec la présence, dans le polonium employé, de faibles quantités de RaE–RaD.

RÉSUMÉ

On a etudié la variation des valeurs de R_F du Pa, Ta, Nb, Zr, Hf, UO_2^{++}, Bi, Pb, Po, Ti et Fe si on fait varier la concentration HCl ou la concentration de HF dans le mélange butanol–HF–HCl–eau. Ainsi on a pu élaborer les séparations suivantes: Pa–Ta–Nb, Ta–Nb, Zr–Nb, Pa–Ti, Pa–Bi, Fe–Pa, Po–Pa.

SUMMARY

The effect of varying the concentration of HCl or of HF in the mixture butanol–HF–HCl–water on the R_F values of Pa, Ta, Nb, Zr, Hf, UO_2^{++}, Bi, Pb, Po, Ti and Fe, has been studied. By choosing suitable mixtures the following separations could be carried out: Pa–Ta–Nb, Ta–Nb, Zr–Nb, Pa–Ti, Pa–Bi, Fe–Pa, Po–Pa.

Bibliographie p. 61.

BIBLIOGRAPHIE

[1] M. LEDERER, *Progrès récents de la Chromatographie*, 3ème Partie, Hermann & Cie, Paris, No. 1240, 1956.
[2] A. J. FUDGE ET J. L. WOODHEAD, *Analyst*, 81 (1956) 417.
[3] K. A. KRAUS ET G. E. MOORE, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 2900.
[4] S. KAHN AND D. E. HAWKINSON, *J. Inorg. Nuclear Chem.*, 3 (1956) 155.
[5] A. G. MADDOCK AND W. PUGH. *J. Inorg. Nuclear Chem.*, 2 (1956) 114.
[6] M. LEDERER ET J. VERNOIS, *Compt. rend.*, 244 (1957) 2388.
[7] M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 5 (1951) 185.
[8] R. G. DE CARVALHO, *Anal. Chim. Acta*, 16 (1957) 555.

Reçu le 10 septembre 1957

METALLIC NITRATES IN THE METHYL ISOBUTYL KETONE–NITRIC ACID SYSTEM

A PAPER CHROMATOGRAPHIC STUDY

AVIEZER STEVAN KERTES

Department of Inorganic and Analytical Chemistry, The Hebrew University, Jerusalem (Israel)

In radiochemical separation processes the chief object is often the efficient extraction of relatively small concentrations of elements formed in irradiation fuels. The starting materials are usually solutions of the fuel in nitric acid of varying concentrations. The selection of a solvent for carrying out a given separation involves a number of considerations[1]. The organic extractants at present most favoured and most widely employed for these separations are methyl isobutyl ketone (MIBK) also called hexone and tributyl phosphate[2].

Since essentially the same information may be obtained from the determination of distribution coefficient and R_F values, the technique of paper chromatography has been applied to the field of radiochemical investigations. For this purpose it is important to know the R_F values of as many ions as possible in one given solvent system. A considerable amount of chromatographic work along these lines has been done on metallic complexes, but most of the work appears to have been restricted to halides[3,4] and—in common with most work in this field—butanol was chosen as the solvent. In the literature there are only isolated reports of experiments in which nitric acid was used in paper chromatographic studies. In spite of the promising results obtained with this solvent using the extraction technique[1,2,7], no work has so far been published on MIBK as an eluting solvent in paper chromatography.

In this study a comparison was made of the chromatographic behaviour of various metals in the MIBK–nitric acid system. Some of the properties of MIBK as a solvent in the presence of various concentrations of aqueous nitric acid are reported.

EXPERIMENTAL

Methyl isobutyl ketone was a Shell pure commercial product and was distilled before use. "Baker's Analyzed" nitric acid, sp. gr. 1.422, was employed.

0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 8 M aqueous nitric acid solutions were prepared by taking aliquots of a 10 M nitric acid stock solution. 150 ml of the aqueous solutions of nitric acid (freshly diluted from the freshly prepared 10 M acid) was mixed with equal volumes of MIBK in a glass-stoppered bottle and equilibrated by mechanical

References p. 66.

shaking at room temperature (25° ± 2°) for 15 min. The bottle was removed from the shaker, the contents transferred to a separatory funnel, 10 min time allowed for separation, and the phases separated. The nitric acid distribution was determined from 10–25 ml aliquots of both layers, taken by pipetting. The portions were transferred to volumetric flasks. The aqueous layer was diluted with water, the MIBK layer with ethanol. The concentrations of nitric acid were determined titrimetrically using a Beckman model H2 pH meter equipped with glass and calomel electrodes, which were checked against a standard aqueous buffer solution. The aqueous solutions were titrated with aqueous sodium hydroxide, and the organic phases with ethanolic sodium hydroxide, the latter being frequently checked against aqueous hydrochloric acid.

The experimental chromatographic technique, the reagents and methods for detection of spots have been described in a previous paper[3]. The chromatograms were developed at room temperature for 2–6 hours, depending on the acid concentration.

RESULTS

Distribution of nitric acid

Table I shows the calculated distribution coefficients. In all cases the total amount of nitric acid found, differed from the amount originally in the aqueous nitric acid

TABLE I

DISTRIBUTION OF NITRIC ACID BETWEEN WATER AND METHYL ISOBUTYL KETONE

$M[HNO_3]$ in original aqu. layer	$\frac{[HNO_3]_o}{[HNO_3]_w}$
0.5	0.076
1	0.112
2	0.221
3	0.290
4	0.350
5	0.394
6	0.437
8	0.480
10	0.518

solution added, by at most ± 1%. The coefficients found differ somewhat from those obtained by Kooi[5]. His results are somewhat higher, showing a greater solubility of nitric acid in the organic phase, especially at higher acid concentrations. These discrepancies are explicable on the assumption that the nitrogen oxide vapours that develop over more concentrated aqueous nitric acid solutions on standing are soluble in the organic phase. In our experiments the two liquids were mixed and equilibrated immediately after preparing the 10 *M* stock solution of nitric acid and its dilution, so that the possibility of nitrogen oxides leaving the aqueous solution was avoided.

References p. 66.

Stability of MIBK–nitric acid solutions

CULLER[2] pointed out the possibility of reaction of MIBK with concentrated nitric acid. We originally planned to extend our study to higher nitric acid concentration than 10 *M*. Under our working conditions it was, however, impossible to mix 12 *M* or more concentrated aqueous nitric acid solution with MIBK. On mixing the two liquids a vigorous reaction took place after a few minutes. The ketone was oxidized to butyric acid (recognized by its unpleasant odour) and nitrogen oxides were liberated.

The separated MIBK layer saturated with 10 *M* aqueous nitric acid undergoes a similar reaction. The time necessary for the oxidation of the ketone is probably dependent on the amount of nitrogen oxide vapours above the aqueous nitric acid solution previous to mixing with the ketone. Thus, fresh 10 *M* solution prepared from non-fuming nitric acid decomposes MIBK only after 24 hours. The same aqueous nitric acid solution mixed with MIBK after a week, oxidizes the MIBK within a few hours. MIBK saturated with freshly prepared 8 *M* aqueous nitric acid decomposes after a week, while when saturated with the same nitric acid solution a week after its preparation it decomposes during the first night; saturated with a fresh 6 *M* solution it only oxidizes after four weeks.

Paper chromatographic experiments

The R_F values of most of the ions investigated were equal to zero independent of the concentration of nitric acid.

The fission product elements were spotted on filter paper as:

$Th(NO_3)_4$	$UO_2(NO_3)_2$	$Ce(NO_3)_3$	$Ce(NO_3)_4$	$Zn(NO_3)_2$
$Sr(NO_3)_2$	$AgNO_3$	$In(NO_3)_3$	$Ba(NO_3)_2$	$La(NO_3)_3$
$Sn(NO_3)_2$	$Y(NO_3)_3$	$ZrO(NO_3)_2$	$Cd(NO_3)_2$	$Sm(NO_3)_3$
$Pr(NO_3)_3$	$Gd(NO_3)_3$	$RbCl$	$CsCl$	$RuCl_3$
$RhCl_3$	$PdCl_2$	$SbCl_3$	GeF_4	$AsCl_3$

and Br^-, I^- and TeO_3^{--} as the sodium salts and the ammonium salt of MoO_4^{--},

only thorium, uranyl, tin, antimony, zirconyl, rubidium, cesium, arsenic and iodine gave R_F values other than zero. Fig. 1 shows the R_F values of the above ions as a function of nitric acid concentration.

Other ions spotted were:

$Pb(NO_3)_2$	KNO_3	$Mg(NO_3)_2$	$Co(NO_3)_2$	$Cu(NO_3)_2$
$Al(NO_3)_3$	$Fe(NO_3)_3$	$Ni(NO_3)_2$	$Cr(NO_3)_3$	$Bi(NO_3)_3$
$Hg(NO_3)_2$	$Be(NO_3)_2$	$TlNO_3$	$Ca(NO_3)_2$	$Mn(NO_3)_2$
$AuCl_3$	H_2PtCl_6	VCl_3	$TiCl_3$	

and the sodium salts of Cl^-, SeO_3^{--} and WO_4^{--},

of which only bismuth, thallium, potassium, mercury and gold gave R_F values other than zero. The corresponding curves are plotted in Fig. 2.

Chromatograms were run in 8 *M* and 10 *M* nitric acid–MIBK mixtures, after they had decomposed. It is significant that the great majority of the ions tested gave high R_F values in these solutions, although their R_F values in the same solutions, but

References p. 66.

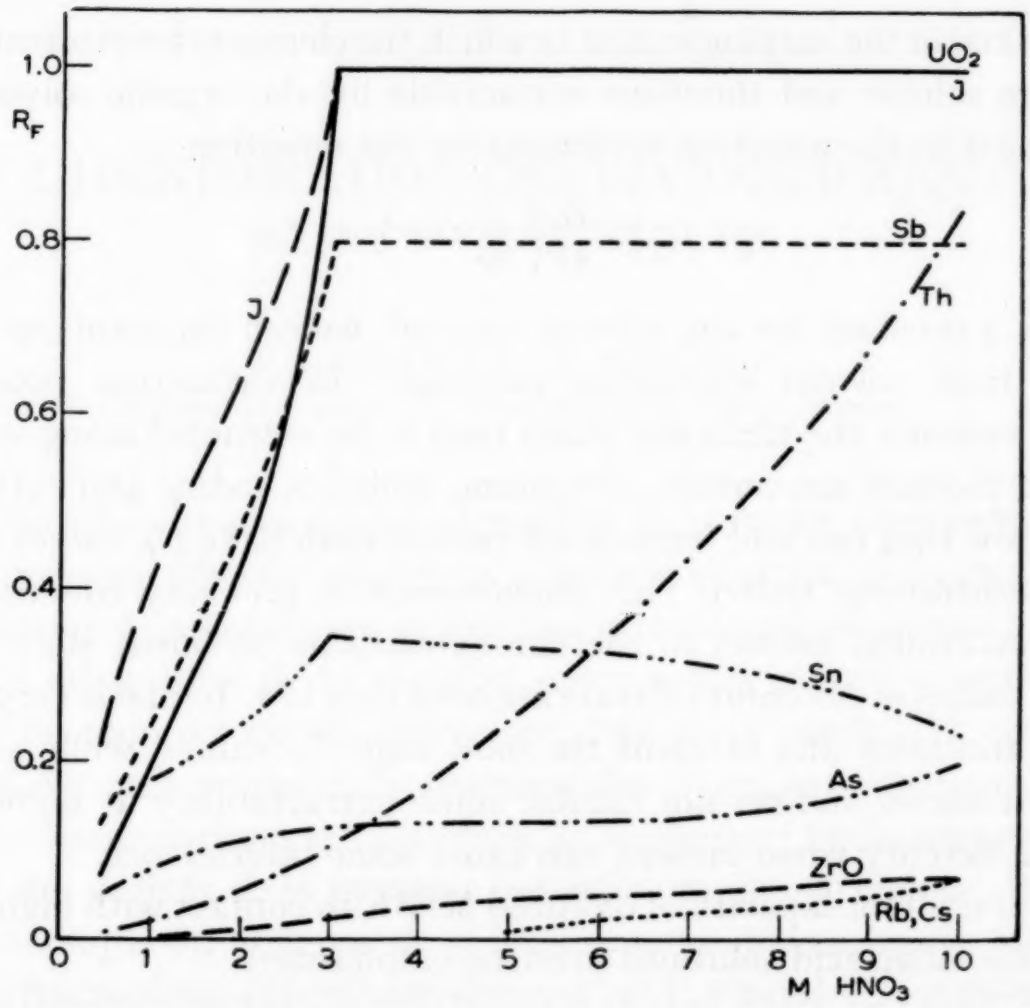


Fig. 1. R_F values of ions plotted against molarity of nitric acid in MIBK–HNO_3 system.

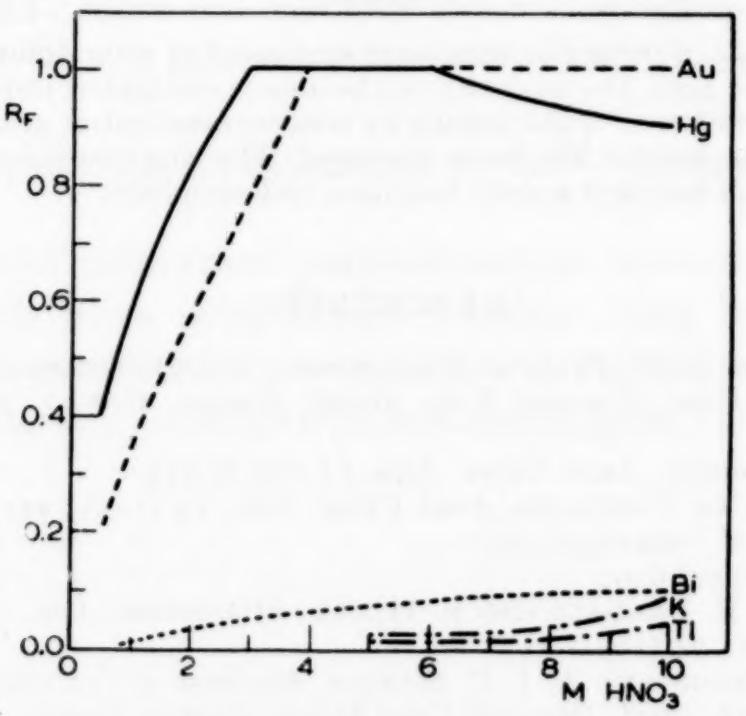


Fig. 2. R_F values of ions plotted against molarity of nitric acid in MIBK–HNO_3 system.

with unoxidized MIBK, were zero. The results with these decomposed solvents were not reproducible and calculation of R_F values would be valueless.

DISCUSSION

Nitrate complexing of metals in aqueous solutions is usually small in comparison with complexing by other ligands. In solvent extraction processes of metals with nitrates

References p. 66.

advantage is taken of the varying extent to which the elements form nitrato-complexes which are more soluble and therefore extractable by the organic solvent. Since R_F values are related to the partition coefficient by the equation

$$a = \frac{A_L}{A_S}\left(\frac{1}{R_F} - 1\right)$$

where A_L/A_S is a constant for any solvent system[6], we can compare our results with those known from solvent extraction processes. In extraction processes, using MIBK–HNO_3 systems, the elements which tend to be extracted along with uranium, plutonium and thorium are cerium, zirconium, niobium, iodine and ruthenium[7]. Our experiments show that ter- and tetravalent cerium both have R_F values equal to zero at all the concentrations tested. This phenomenon is probably connected with the reduction of tetravalent cerium to the non-extractable tervalent state by the filter paper. The R_F values of zirconium nitrate are only very low. Iodine is very extractable. Furthermore, antimony and bivalent tin show high R_F values, while arsenic and to some extent rubidium and cesium exhibit some extractability at higher nitric acid concentration. Mercury when present can cause some interference.

The high extraction capacity of oxidized MIBK in contact with higher concentrations of aqueous nitric acid solutions must be emphasized.

SUMMARY

The R_F values of a number of inorganic ions were measured in nine different mixtures of methyl isobutyl ketone with nitric acid. The majority of the ions investigated were not extracted by these mixtures ($R_F = 0$). The oxidation of the ketone by concentrated nitric acid and its effect upon the extraction capacity of the ketone has been discussed. The distribution coefficient of nitric acid between water and methyl isobutyl ketone has been redetermined.

REFERENCES

1 C. M. NICHOLLS, *Intern. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy, Geneva*, 1955, Paper No. P/414.
2 F. L. CULLER, *Intern. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy, Geneva*, 1955, Paper No. P/541; No. P/822.
3 S. KERTES AND M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 15 (1956) 543.
4 M. LEDERER AND R. G. DE CARVALHO, *Anal. Chim. Acta*, 13 (1955) 437;
R. G. DE CARVALHO, *ibid.*, 16 (1957) 555;
M. LEDERER, *ibid.*, 4 (1950) 629;
J. M. LADENBAUER, L. K. BRADACS AND F. HECHT, *Mikrochim. Acta*, (1954) 388.
5 J. KOOI, *Rec. trav. chim.*, 74 (1955) 137.
6 R. CONSDEN, A. H. GORDON AND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
7 R. E. TOMLINSON, *Intern. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy, Geneva*, 1955, Paper No. P/824; F. R. BRUCE, *ibid.*, No. P/719.

Received October 4th, 1957

SUR L'IDENTIFICATION CHROMATOGRAPHIQUE DE BASES PYRAZINIQUES

P. DIETRICH ET D. MERCIER
Institut de Biologie Physico-chimique, Paris (France)

Au cours des dernières années un grand nombre de travaux concernant l'altération des sucres en présence d'acides aminés ou d'amines (réaction de MAILLARD[1]) ont été publiés. Un résumé complet de ces recherches a été donné récemment par HODGE[2]. En étudiant le mécanisme de la réaction entre sucres et acides aminés, plusieurs auteurs[3–7] ont pu montrer que le traitement d'un sucre par le NH_3 (ou une amine) fournit, parmi d'autres produits de réaction, des bases pyraziniques. Il est connu aussi que les composés carbonylés, α-aminés, se condensent facilement sur eux-mêmes en fournissant des dérivés de la pyrazine (ou de la dihydro-pyrazine). Ainsi p. ex. une solution méthanolique ou aqueuse de D-fructosamine dépose, après quelques jours, des cristaux de fructosazine (di-(tétrahydroxy-1′,2′,3′,4′butyl-1′)-2,5 pyrazine)[8]. Etant donné que l'isolement des bases pyraziniques du milieu réactionel est souvent assez difficile, nous voudrions décrire une méthode chromatographique que nous utilisons, dans notre laboratoire, pour la détermination de bases dérivées de la pyrazine.

SÉPARATION DE PYRAZINES EN PHASE GAZEUSE

Au cours de nos travaux nous étions particulièrement interessés dans la séparation et la détermination de bases pyraziniques volatiles. Ainsi nous étions amenés à étudier tout d'abord la possibilité d'une séparation de ces bases par chromatographie gaz-liquide. Cette méthode a été employée avec succès pour l'identification de bases

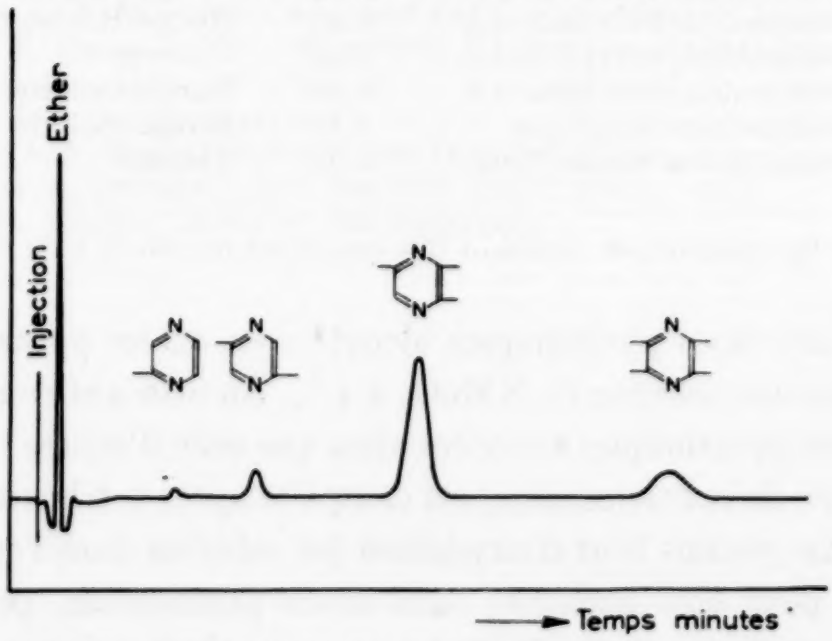


Fig. 1. Chromatographie gaz-liquide d'une préparation synthétique de triméthylpyrazine, montrant des impuretés mono-, di- et tétra-méthylés.

Bibliographie p. 69.

pyridiniques[9–11]. Quelques essais d'orientation nous ont montré que, par chromatographie gaz-liquide, on arrive facilement à séparer les différentes bases pyraziniques homologues, c'est à dire pyrazine, monométhyl-pyrazine, diméthyl-pyrazine etc. Dans la Fig. 1 nous reproduisons une chromatographie typique d'un mélange de bases pyraziniques méthylées.

Par contre, des essais de séparation de bases pyraziniques isomères, comme celle des diméthyl-pyrazines (2,3-, 2,5- et 2,6), qui montrent de très faibles différences de point d'ébullition, ne donnaient pas des résultats satisfaisants. Pour cette raison nous nous sommes proposés de combiner, pour l'identification des bases pyraziniques volatiles, la chromatographie gaz-liquide à la chromatographie sur papier.

SÉPARATION DES ACIDES PYRAZINE-CARBOXYLIQUES SUR PAPIER

L'identification des bases pyraziniques méthylées ou alcolylées séparées d'abord en groupes par chromatographie en phase gazeuse, peut être effectuée par chromatographie sur papier des acides pyrazine-carboxyliques, obtenus par oxydation par le $KMnO_4$. En suivant un travail de KUFFNER ET FADERL[12] qui ont décrit la séparation chromatographique sur papier des différents acides pyridine-mono- et di-carboxyliques nous avons trouvé que le mélange *n*-butanol–acide formique–eau (4:1:1) convenait bien pour la séparation des acides pyrazine-carboxyliques. La révélation des acides pyrazine-carboxyliques peut être éffectuée facilement par une solution aqueuse de $FeSO_4$. Dans le Tableau I nous donnons les valeurs des R_F obtenues pour les différents acides.

TABLEAU I

VALEURS DES R_F DES ACIDES PYRAZINE-CARBOXYLIQUES

Solvent: *n*-butanol-acide formique-eau (4:1:1); révélation: $FeSO_4$

Acide	R_F*	*Coloration avec $FeSO_4$*
Pyrazine-monocarboxylique	0.64	Rouge-jaune
Pyrazine-dicarboxylique-2,3	0.49	Rouge-Bordeaux
Pyrazine-dicarboxylique-2,5	0.42	Violette
Pyrazine-dicarboxylique-2,6	0.71	Rouge-violette
Pyrazine-tricarboxylique	0.57	Rouge-violette
Pyrazine-tétracarboxylique	0.31	Violette

* Valeurs de R_F obtenues en utilisant des quantités de 10–15 γ de chaque acide.

Pour l'oxydation des bases pyraziniques alcoylées en acides pyrazine-carboxyliques nous avons employé une solution de $KMnO_4$ à 4 %. En utilisant ce réactif l'oxydation des différentes bases pyraziniques alcoylées ainsi que celle d'autres bases pyraziniques (comme par exemple de la fructosazine) est complète après 5–6 heures (à une température de 80–100°). Le produit brut d'oxydation (en solution dans l'eau et après décantation du MnO_2) peut être employé, sans autre purification, pour les chromatographies sur papier. Ceci permet d'effectuer ces oxydations en partant de 1–2 mg d'un mélange de bases pyraziniques.

Bibliographie p. 69.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Chromatographie gaz-liquide

Les chromatographies des bases pyraziniques volatiles ont été effectuées sur un appareil de la maison Griffin & Tatlock, Angleterre.
Phase stationnaire: Di-nonyl-phtalate.
Phase mobile: Azote (débit: 2.8 l/h).
Température de la colonne: 120°.
Pression à l'entrée de la colonne: 400 mm.
Pression à la sortie de la colonne: 90 mm.

Chromatographie sur papier

Pour toutes les chromatographies nous avons employé le papier Whatman No. 1 (chromatographies ascendantes en laissant couler le solvant pendant 15 heures; la révélation est faite avec une solution de $FeSO_4$ à 0.5 %). Le solvant indiqué plus haut (*n*-butanol–acide formique–eau (4:1:1)) permet une bonne séparation des différents acides pyrazine-carboxyliques.

REMERCIMENTS

Nous remercions Monsieur E. LEDERER de l'intérêt qu'il a témoigné à ce travail et les Etablissements Firmenich et Cie. (Genève) pour leur aide financière.

RÉSUMÉ

Description de la séparation de bases pyraziniques volatiles par chromatographie gaz-liquide et de la séparation des acides pyrazine-carboxyliques par chromatographie sur papier.

SUMMARY

Description of the separation of volatile pyrazine bases by gas-liquid chromatography and the separation of the pyrazine-carboxylic acids by paper chromatography.

BIBLIOGRAPHIE

1 L. C. MAILLARD, *Compt. rend.*, 154 (1912) 66.
2 J. E. HODGE, *Agricultural and Food Chem.*, 1 (1953) 928.
3 A. GOTTSCHALK, *Nature*, 167 (1951) 845.
4 C. D. HURD, in *Contributions of Browning Research to Ration Item Stability*, pp. 21–23, Chicago, Ill., Research and Development Associates, Food and Container Institute, Inc., 1952.
5 L. F. WIGGINS ET W. S. WISE, *Chem. and Ind.*, (1955) 656.
6 B. K. DAVISON ET L. F. WIGGINS, *Chem. and Ind.*, (1956) 982.
7 L. HOUGH, J. K. N. JONES ET E. L. RICHARDS, *J. Chem. Soc.*, (1952) 3854.
8 L. DE BRUYN, *Rec. trav. chim.*, 18 (1899) 72.
9 A. T. JAMES, *Biochem. J.*, 52 (1952) 242.
10 W. J. MURRAY ET A. F. WILLIAMS, *Chem. and Ind.*, (1956) 1020.
11 V. T. BROOKS ET G. A. COLLINS, *Chem. and Ind.*, (1956) 1021.
12 F. KUFFNER ET N. FADERL, *Monatsh.*, 86 (1955) 995.

Reçu le 5 juin 1957

SÉPARATION DES ACIDES ALIPHATIQUES VOLATILS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

ROGER OSTEUX, JEAN GUILLAUME* ET JEAN LATURAZE

Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie (Prof. P. Boulanger) et Institut Pasteur (Prof. Ch. Gernez-Rieux), Lille (France)

INTRODUCTION ET HISTORIQUE

Les acides aliphatiques volatils de C_1 à C_6, exception faite de l'acide formique, ont des propriétés chimiques très voisines et l'on conçoit que leur séparation, leur identification, et leur dosage soient difficilement réalisables d'une façon parfaite. Aussi, de nombreuses méthodes ont-elles été proposées, que l'on peut classer et résumer de la façon suivante.

(a) *Méthodes par extraction ou distillation*

Les constantes physiques des acides aliphatiques volatils varient légèrement lorsque l'on passe d'un terme à l'autre de la série: de C_1 à C_6, la température d'ébullition augmente, la vitesse d'entraînement par la vapeur d'eau croît, le coefficient de répartition entre l'eau et les solvants organiques décroît; il est donc normal que les méthodes de séparation soient des méthodes physiques. La technique de DUCLAUX[1] et ses nombreuses modifications sont fondées sur ces deux principes: tout d'abord les acides volatils distillent à une vitesse variable selon leur nombre d'atomes de carbone; ensuite, dans un mélange de deux acides, chacun est entraîné par la vapeur d'eau selon ses caractéristiques propres, sans que l'autre intervienne. La détermination se ramène donc à l'établissement de la courbe de l'acidité titrable du distillat en fonction de son volume, et à sa comparaison aux courbes témoins.

Dans la méthode de séparation des acides volatils introduite par BEHRENS[2], puis complétée par WERKMAN[3], on fait appel au coefficient de répartition entre un solvant organique et l'eau, ce coefficient ne dépendant pas de la présence d'un autre acide.

Ces méthodes présentent deux inconvénients majeurs:

1. elles permettent de déterminer les composants d'un mélange binaire, mais ne donnent pas le moyen de savoir si l'on se trouve uniquement en présence d'un mélange de deux acides;

2. elles ne réalisent pas la séparation effective des acides et la composition du mélange est obtenue par calcul et non par dosage direct.

SCHICKTANZ *et al.*[4] ont introduit en 1940 un procédé fondé sur la distillation des azéotropes formés par les acides et les hydrocarbures acycliques; ils ont obtenu de bonnes séparations, non quantitatives cependant. La complexité du procédé le rend inutilisable pour des analyses en série.

(a) *Chromatographie de partage sur colonne*

En 1942, LESTER SMITH[5] a montré que, par chromatographie sur colonne de gel de silice, on pouvait séparer les composants d'un mélange d'acides formique, acétique, propionique, butyrique, valérianique. ELSDEN[6] a repris ce travail et précisé les conditions expérimentales: la colonne de gel de silice est imbibée d'une solution de vert de bromocrésol; la phase mobile est composée de chloroforme et de butanol et la migration des acides est suivie grâce à la coloration jaune du vert de bromocrésol. L'acide formique, fortement retenu, ne peut être élué. Les autres acides passent dans l'ordre inverse de leur poids moléculaire et sont titrés dans le liquide d'élution. L'acide acétique, élué le dernier, passe en même temps que l'indicateur; il ne peut donc être dosé que par différence, l'acide formique ayant été éliminé par la méthode de FRIEDEMANN[7] (distillation en présence d'oxyde mercurique). Cette méthode a été mise en œuvre dans des conditions expérimentales très voisines par RAMSEY ET PATTERSON[8], NIJKAMP[9], KRETOVITCH *et al.*[10]. NEISH[11] a

* Chargé de Recherches du Centre National de la Recherche Scientifique.

Bibliographie p. 84/85.

préconisé comme phase mobile le mélange benzène et butanol, NIJKAMP[12] le mélange tétrachlorure de carbone et butanol, qui permet de doser l'acide acétique.

SYNGE[13] a étudié le manque de régularité du front et les variations de la vitesse de migration, qu'il attribue à l'ionisation en phase aqueuse, tandis qu'en phase organique mobile, il n'existe que des molécules non dissociées. MOYLE, BALDWIN ET SCARISBRICK[14] ont mis en pratique cette théorie et ont utilisé un gel de silice tamponné, sans indicateur interne; ils ont obtenu ainsi une bonne séparation des acides de la série normale. PETERSON ET JOHNSON[15] sont parvenus à des résultats analogues avec une colonne de Celite saturée d'acide sulfurique, la phase mobile étant le benzène.

Parallèlement, différents auteurs se sont attachés à la détermination des acides de la série ramifiée, dite "*iso*". RAMSEY[16] a séparé partiellement l'acide butyrique de l'acide *iso*butyrique par double chromatographie sur colonnes de gel de silice. BUEDING ET YALE[17] ont séparé les isomères de l'acide valérianique sur colonne de Celite tamponnée par du phosphate à pH 6.5. Les acides du rumen ont de même été déterminés par GRAY *et al.*[18] grâce à des chromatographies successives.

Enfin, JAMES ET MARTIN[19] ont décrit leur méthode de séparation chromatographique gaz–liquide et l'ont appliquée au fractionnement des acides volatils. D'après les courbes présentées par ces auteurs, cette technique semble excellente; ANNISON[20] l'a mise en œuvre pour l'étude de certains liquides biologiques: sang, salive, suc gastrique et liquide céphalo-rachidien. (Voir aussi les modifications techniques proposées par VAN DE KAMER, GERRITSMA ET WANSINK[21]).

Les méthodes de séparation sur colonne donnent dans l'ensemble des résultats satisfaisants, notamment du point de vue quantitatif. Cependant, en dehors des difficultés générales de séparation de l'acide formique, il faut remarquer que les opérations sont longues et délicates et par suite se prêtent mal à des déterminations en série.

(c) *Chromatographie sur papier*

Plusieurs auteurs ont déjà tenté, avec plus ou moins de succès, de vaincre les difficultés inhérentes à la chromatographie sur papier des termes inférieurs de la série des acides aliphatiques.

En 1949, FINK ET FINK[22] ont proposé de transformer au préalable les acides volatils en *hydroxamates*, en faisant réagir les esters avec l'hydroxylamine. La chromatographie des hydroxamates est réalisée en utilisant comme phase mobile de l'acide isobutyrique ou du phénol saturés d'eau. Les auteurs obtiennent une bonne séparation des acides de C_1 à C_6, mais la grande mobilité des hydroxamates dans ces solvants fait qu'ils se tassent dans la partie inférieure de la feuille. La révélation est effectuée par pulvérisation d'une solution de chlorure ferrique: il se forme un complexe rouge pourpre avec les hydroxamates.

INOUE ET NODA[23] ont décrit une technique analogue. THOMPSON[24] a essayé de nombreux solvants, parmi lesquels les mélanges alcool amylique/acide acétique/eau (4:1:5) et alcool octylique/acide formique/eau (75:25:25) donnent un échelonnement correct des taches. Signalons que STADTMAN ET BARKER[25] ont utilisé la même transformation préalable en hydroxamates pour la séparation des acyl-phosphates; la chromatographie est faite avec le solvant butanol saturé d'eau.

SATAKE ET SEKI[26] ont séparé les acides volatils sous forme de leurs *hydrazides*, obtenus par chauffage des acides en présence d'hydrate d'hydrazine à 110°–130° C. Le solvant utilisé se compose d'alcool isoamylique, de collidine et d'eau (10:2:1). La révélation est réalisée par le nitrate d'argent ammoniacal.

Constatant les inconvénients de la préparation des hydroxamates ou des hydrazides, la plupart des auteurs ont essayé de séparer les acides sous forme de sels, la chromatographie des acides libres étant gênée par leur grande volatilité.

Bibliographie p. 84/85.

BROWN ET HALL[27] ont décrit une technique de chromatographie des sels de sodium des acides voltails. Les solvants sont le butanol saturé d'ammoniaque 1.5 *N*, ou le mélange butanol/éthanol/ammoniaque 3 *N* (4:1:5). Les R_F sont donnés dans le Tableau I. Après séchage, on pulvérise une solution de bleu de bromothymol ajustée à pH 7.5 par de la soude. Les taches jaunes sur fond bleu sont très fugaces. HISCOX ET BERRIDGE[28] ont abandonné les sels de sodium pour les sels d'ammonium ou d'éthanolamine. Le solvant se compose de butanol saturé de la base utilisée. Les acides de C_2 à C_6 sont bien séparés (Tableau I). La révélation est faite à l'aide d'une solution de vert de bromocrésol amenée à pH 5.5 par de l'acide citrique. La base est retenue au niveau des acides et ceux-ci apparaissent en bleu sur un fond acide jaune. VIRTANEN ET MIETTINEN[29] ont de même chromatographié les sels de diéthyl-

TABLEAU I

	BROWN ET HALL[27] *1950*	HISCOX ET BERRIDGE[28] *1950*	KENNEDY ET BARKER[34] *1951*	REID ET LEDERER[35] *1951*	ISHERWOOD ET HANES[39] *1953*		
Sels des acides	Sodium	Ammonium Ethanolamine	Ammonium	Ammonium	Ammonium		
Solvants	Butanol saturé d'ammoniaque 1.5 *N*	Butanol saturé d'une solution d'éthanolamine	a. Ethanol/ NH_3 conc./ eau (95:1:5) b. Butanol/ eau/diéthylamine (100:15:1)	Butanol saturé d'ammoniaque 1.5 *N*	a. Propanol/ NH_3 conc. (7:3) b. Propanol/ NH_3 conc. (9:1) c. Propanol/ NH_3 conc. (6:4)		
R_F			*a* *b*		*a*	*b*	*c*
Ac. formique	0.09		0.31	0.10			
Ac. acétique	0.10	0.20	0.33 0.28	0.11	0.37	0.13	0.52
Ac. propionique	0.19	0.31	0.44 0.41	0.19	0.48	0.25	0.61
Ac. butyrique	0.33	0.44	0.54 0.51	0.29	0.57	0.33	0.69
Ac. valérianique	0.45	0.55	0.60 0.56	0.41	0.69	0.44	0.80
Ac. caproïque	0.61	0.77	0.68	0.53	0.73	0.52	0.84
Indicateur pour révélation...	Bleu de Bromothymol à 0.04 p. 100 d'eau ajusté à pH 7.5 par NaOH	Vert de Bromocrésol à 0.04 p. 100 d'éthanol ajusté à pH 5.5 par ac. citrique	Bleu de Bromophénol à 0.05 p. 100 d'eau + 0.20 g acide citrique	Pourpre de Bromocrésol à 0.04 p. 80 d'éthanol + 20 de formalin	Bleu de thymol à 0.10 p. 100 d'eau ajusté à pH 10 par NaOH *N*/10		
Coloration:							
taches acides	jaune	bleu	bleu	jaune	jaune		
fond	bleu	jaune	jaune	pourpre	bleu		
Estimation quantitative				Mesure de la surface des spots	Elution et titration colorimétrique		

Bibliographie p. 84/85.

amine et ont utilisé cette technique pour les dosages en série de l'acide butyrique dans les "silages" (végétaux en silo). Les sels de diéthylamine ont été encore employés par LONG *et al.*[30], puis par JONES *et al.*[31]. BÖRJE ET TORSTEN[32] ont tenté de rendre la méthode plus précise en déterminant sur le chromatogramme les acides formique, acétique et lactique par des révélations spécifiques. BURTON[33] a modifié la technique de révélation: la solution alcoolique de vert de bromocrésol est pulvérisée avant le séchage complet de la feuille; les anions donnent une coloration bleue stable.

En 1951, KENNEDY ET BARKER[34] ont proposé une méthode de séparation des sels d'ammonium par le solvant éthanol/ammoniaque concentrée/eau (95:1:5). Les R_F obtenus sont reproduits dans le Tableau I: on remarque le léger décalage entre l'acide formique et l'acide acétique. Mais la difficulté d'effectuer des chromatographies convenables avec un solvant à base d'éthanol oblige les auteurs à préparer auparavant le papier filtre pour éliminer les taches "fantômes"; ils lavent le papier avec une solution d'acide oxalique à 1 p. 100, puis le rincent plusieurs fois à l'eau distillée.

La même année, REID ET LEDERER[35] ont publié une méthode très intéressante: la chromatographie des sels d'ammonium est réalisée à l'aide du solvant classique-butanol saturé d'ammoniaque 1.5 *N* (Tableau I). La révélation est faite par pulvérisation d'une solution de pourpre de bromocrésol contenant 20 p. 100 de formaldéhyde; celui-ci se combine à l'ammoniaque et libère les acides; si l'ont fait subir ensuite au papier l'action ménagée de vapeurs ammoniacales, le fond se colore en rouge, alors que les acides se détachent en jaune. Les auteurs envisagent aussi une possibilité de dosage par la mesure des aires des taches acides. Ce procédé permet une estimation quantitative, dont l'erreur, selon ces auteurs, est inférieure à 5 p. 100; JACQUET ET VILLETTE[36] l'ont utilisé avec succès en microbiologie. MUNIER[37] a amélioré la méthode de REID ET LEDERER en ajoutant de l'acétone à la phase organique et en remplaçant le formaldéhyde par l'acétaldéhyde dans l'indicateur. DUNCAN ET PORTEOUS[38] ont proposé de laver le papier-filtre avec la phase alcoolique d'une solution de butanol saturée d'ammoniaque. La révélation est réalisée par pulvérisation d'une solution de rouge de méthyle et de bleu de bromothymol ajustée à pH 5.2 et additionnée de formaldéhyde. Les taches des acides apparaissent en rouge sur fond vert.

En 1953, ISHERWOOD ET HANES[39] ont décrit leur technique originale, dans laquelle les sels d'ammonium sont séparés par des solvants à base de propanol (Tableau I). Le papier est préalablement lavé successivement à l'acide acétique, à l'eau distillée et à l'ammoniaque 10 *N*. La solution révélatrice est une solution de bleu de bromothymol amenée à pH 10 par de la soude; la révélation ne peut se faire que dans une atmosphère privée de gaz carbonique. Les auteurs dosent les acides par colorimétrie après repérage des bandes à l'aide d'un chromatogramme-témoin, découpage et élution.

Le nombre des techniques successives et des améliorations proposées fait présager qu'elles ne sont pas sans défauts. Ceux-ci sont avant tout:

1. la difficulté de révélation, qui nécessite soit la pulvérisation d'un indicateur coloré dans une atmosphère privée de CO_2 (ISHERWOOD ET HANES[39]), soit le lavage fastidieux des feuilles de papier-filtre (KENNEDY ET BARKER[34], ISHERWOOD ET HANES[39], DUNCAN ET PORTEOUS[38]): en général, ce sont les techniques de HISCOX ET

Bibliographie p. 84/85.

BERRIDGE[28] et de REID ET LEDERER[35] qui ont séduit les utilisateurs par leur simplicité;

2. les conditions même de la chromatographie: dans le cas des sels de sodium (BROWN ET HALL[27]), on est gêné par *la tache alcaline de l'ion sodium, qui masque la tache de l'acide acétique*; quand on sèche les chromatogrammes, il y a une perte certaine en acides, variable selon les conditions de séchage et les solvants utilisés: l'acétate et le propionate d'ammonium disparaissent les premiers; d'autre part, l'utilisation d'un indicateur acide, qui permet de déceler les ions ammonium retenus au niveau des acides, alors que le fond du papier reste lui-même acide, n'est pas satisfaisante;

3. l'impossibilité de *séparer les acides formique et acétique, les acides de la série normale et ceux de la série "iso"*.

TECHNIQUE PERSONNELLE

Les problèmes que nous avions à résoudre pour la chromatographie sur papier des acides aliphatiques volatils des milieux biologiques étaient donc les suivants:

1. obtention des acides sous forme d'acides libres en solution suffisamment concentrée pour être chromatographiée;

2. recherche de phases mobiles permettant la séparation de tous les acides volatils de C_1 à C_6, y compris celle du formique et de l'acétique, et d'autre part la séparation des acides de la série "*iso*" de ceux de la série normale;

3. mise au point d'une technique de révélation permettant d'obtenir des taches colorées relativement stables par simple pulvérisation;

4. simplification des opérations, aux dépens même de la sensibilité, l'estimation semi-quantitative restant néanmoins possible.

Nous avons mis au point une technique qui nous paraît répondre à ces exigences: elle a fait l'objet d'une note préliminaire en 1955[40] et nous nous proposons de la décrire maintenant d'une façon plus détaillée.

(*a*) *Préparation des solutions d'acides*

La concentration optima pour la chromatographie est de 0.5 à 5 millimolécules pour 10 ml, le volume de solution mis en jeu étant de 5 à 20 μl.

(1) *Entraînement à la vapeur*

L'extraction est faite selon la technique décrite par DYER[41], par entraînement à la vapeur d'eau. Ce procédé obligeant à recueillir un volume très grand de distillat pour être quantitatif a été modifié par OLMSTED *et al.*[42]. Ces auteurs distillent en présence de sulfate de magnésium à saturation: la proportion des acides passant dans les premières fractions est très augmentée. FRIEDEMANN[7] traite préalablement le liquide par le tungstate de sodium avant entraînement à la vapeur, ce qui empêche la mousse et permet de mener l'opération plus rapidement. L'entraînement à la vapeur est effectué en présence d'acide sulfurique et de sulfate de magnésium.

Nous avons étudié l'influence du sulfate de magnésium à saturation sur la distilla-

TABLEAU II

ENTRAÎNEMENT À LA VAPEUR D'EAU DE 1000 μM D'ACIDES DANS 100 ml D'EAU, EN PRÉSENCE OU ABSENCE DE SULFATE DE MAGNÉSIUM + 1 ml H_2SO_4 CONCENTRÉ

Distillat recueilli	*100 ml*		*200 ml*	
	SO_4Mg		*SO_4Mg*	
	sans	*avec*	*sans*	*avec*
Ac. formique distillé	210 μM	350 μM	410 μM	600 μM
Ac. acétique distillé	355 μM	730 μM	590 μM	940 μM
Ac. propionique distillé	610 μM	950 μM	880 μM	1000 μM
Ac. butyrique distillé	805 μM	970 μM	1000 μM	1000 μM

tion des acides. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau II. Nous voyons qu'en recueillant 200 ml de distillat, on obtient quantitativement les acides à partir de C_2; mais 60 p. 100 seulement de l'acide formique passent dans le distillat (WITZEMANN)[43]. Il est à remarquer que les conditions opératoires jouent un rôle certain dans la quantité d'acide recueillie, en particulier la vitesse de passage du courant de vapeur d'eau et surtout la concentration initiale de la liqueur à distiller (dans toutes nos expériences, le volume du ballon contenant la solution acide a été maintenu constant par réglage du chauffage).

Nous avons essayé de définir les meilleures conditions d'entraînement à la vapeur, applicables aux liquides biologiques et aux milieux de culture bactériens en particulier. 10 à 50 ml du liquide sont additionnés de 1 ml d'acide sulfurique concentré, puis de 15 ml de solution aqueuse de tungstate de sodium à 10 p. 100. On ajoute enfin 15 ml d'une solution de sulfate de magnésium à 50 p. 100 (poids/volume). On agite après chaque addition. Le ballon est monté sur le générateur de vapeur d'eau; on chauffe jusqu'à ébullition, puis on distille à feu doux, jusqu'à un volume de 25 ml; pendant ce temps la vapeur est réglée pour passer bulle par bulle. Lorsque le volume de 25 ml est atteint, on met en veilleuse sous le ballon et l'on fait passer rapidement la vapeur d'eau. On arrête l'entraînement lorsque l'on a distillé 250 ml de liquide. L'opération dure environ 20 minutes. Dans ces conditions, nous recueillons 97 p. 100 de l'acide formique et la totalité des autres acides volatils; 4 à 6 p. 100 de l'acide lactique sont également entraînés. Nous avons pu observer que, lorsque la quantité d'acide lactique contenue dans la prise d'essai était inférieure à 140 mg, cet acide n'était pas décelé par notre technique chromatographique et n'était pas gênant. Dans le cas où cette dose est dépassée, on effectue un deuxième entraînement à la vapeur, après avoir concentré le premier distillat en présence d'un excès de soude. Cette précaution est d'ailleurs rarement nécessaire, car la présence de 140 mg dans la prise d'essai correspond à une quantité initiale d'acide lactique allant de 3 g à 12 g par/litre selon le volume traité. Quant à l'acide pyruvique, qui troublerait la chromatographie et dont 10 à 40 p. 100 sont entraînés par la vapeur, il est totalement détruit lors des opérations ultérieures; sa présence n'est gênante que pour le dosage de l'acidité totale. FRIEDEMANN[7] a proposé de s'en débarrasser par distillation sur oxyde jaune de mercure, mais cette opération élimine l'acide formique. Aussi préférons-nous précipiter les acides cétoniques par addition ménagée de 2,4-dinitrophénylhydrazine

Bibliographie p. 84/85.

en solution sulfurique, après défécation tungstique; la liqueur filtrée est directement soumise à l'entraînement par la vapeur.

(2) *Dosage de l'acidité volatile totale*

Le distillat contient toujours une proportion variable d'anhydride carbonique, en particulier lors de la distillation de cultures bactériennes gazogènes. Il doit être éliminé, car il donne une acidité titrable non négligeable et empêche le virage net de l'indicateur coloré. Par barbotage d'air privé de CO_2 durant quelques minutes (FRIEDEMANN[7]), on peut éliminer l'erreur due à l'acidité titrable; mais nous avons préféré la technique de ELSDEN[6] qui consiste à faire barboter de l'azote pendant toute la titration; dans nos conditions expérimentales, le gaz employé étant de l'azote pur, il faut 1,5 minute pour éliminer le CO_2 de 100 ml de solution, 3 minutes pour 250 ml de solution. Les acides volatils ne commencent à être entraînés qu'après plus de 10 minutes de barbotage, temps largement suffisant pour effectuer la titration. Celle-ci est faite avec de la soude $N/10$ en présence d'orthocrésol-sulfone-phtaléine (en solution aqueuse à 1 p. 100).

(3) *Concentration de la solution d'acides*

Après addition d'un léger excès de soude, on concentre par ébullition jusqu'à 1 ml environ. Pour éliminer l'ion sodium, nous avons employé des résines échangeuses d'ions. Les résines anioniques faibles (type *Amberlite IR4B*) retiennent très mal les acides faibles; les résines anioniques fortes retiennent bien les acides, mais leur élution par les bases faibles est difficile. Nous avons donc utilisé des résines cationiques sulfonées (*Permutite 50, Amberlite IR 120*). Elles retiennent l'ion sodium, les acides se retrouvant à l'état libre dans les eaux de lavage. Chaque échantillon de résine est dosé avant usage; nos prises d'essais fixent toujours environ 30 ml de soude $N/1$ par gramme. On met en présence du résidu d'évaporation des sels de sodium la quantité de résine calculée selon les résultats du dosage précédent; on ajoute un peu d'eau distillée si c'est nécessaire. Après agitation, on laisse 5 minutes en contact, puis on filtre sur coton hydrophile dans un petit entonnoir. Le filtrat est recueilli dans un tube contenant une quantité de solution de morpholine $N/1$ correspondant aux acides volatils titrés. La résine est lavée à l'eau distillée par fractions de 1 ml. La liqueur acide filtrante est jaune; elle vire au rouge au contact de la morpholine. On arrête le lavage lorsque l'indicateur devient orangé. On a ainsi recueilli tous les acides initialement titrés. On ajoute alors une goutte de morpholine pure, pour assurer la fixation des acides. Cette solution se conserve indéfiniment en chambre froide, en flacon bouché au caoutchouc.

(4) *Limites de la technique de concentration*

Une opération menée correctement permet de recueillir tous les acides dans un volume de liquide égal à 20 fois le poids de résine utilisée (pour 0.50 g de résine, correspondant à 1500 μM d'acides, on obtient 10 ml de solution). La concentration est alors correcte.

Bibliographie p. 84/85.

(*b*) *Chromatographie sur papier*

(1) *Choix des solvants mobiles organiques*

a. Parmi les hydrocarbures liquides, le benzène et le cyclohexane donnent une bonne résolution des taches; aucun ne sépare l'acide formique de l'acide acétique.

b. Les alcools aliphatiques saturés de la série normale de C_1 à C_8, et les alcools à chaînes latérales, secondaires ou tertiaires, de C_3 à C_5, ne nous ont pas permis la séparation de ces acides, ni des acides "iso" et normaux. Les alcools éthylique et méthylique tendent à étirer la tache acétique-formique (voir les R_F du Tableau I); mais la résolution est d'une façon générale mauvaise, le solvant formant des taches

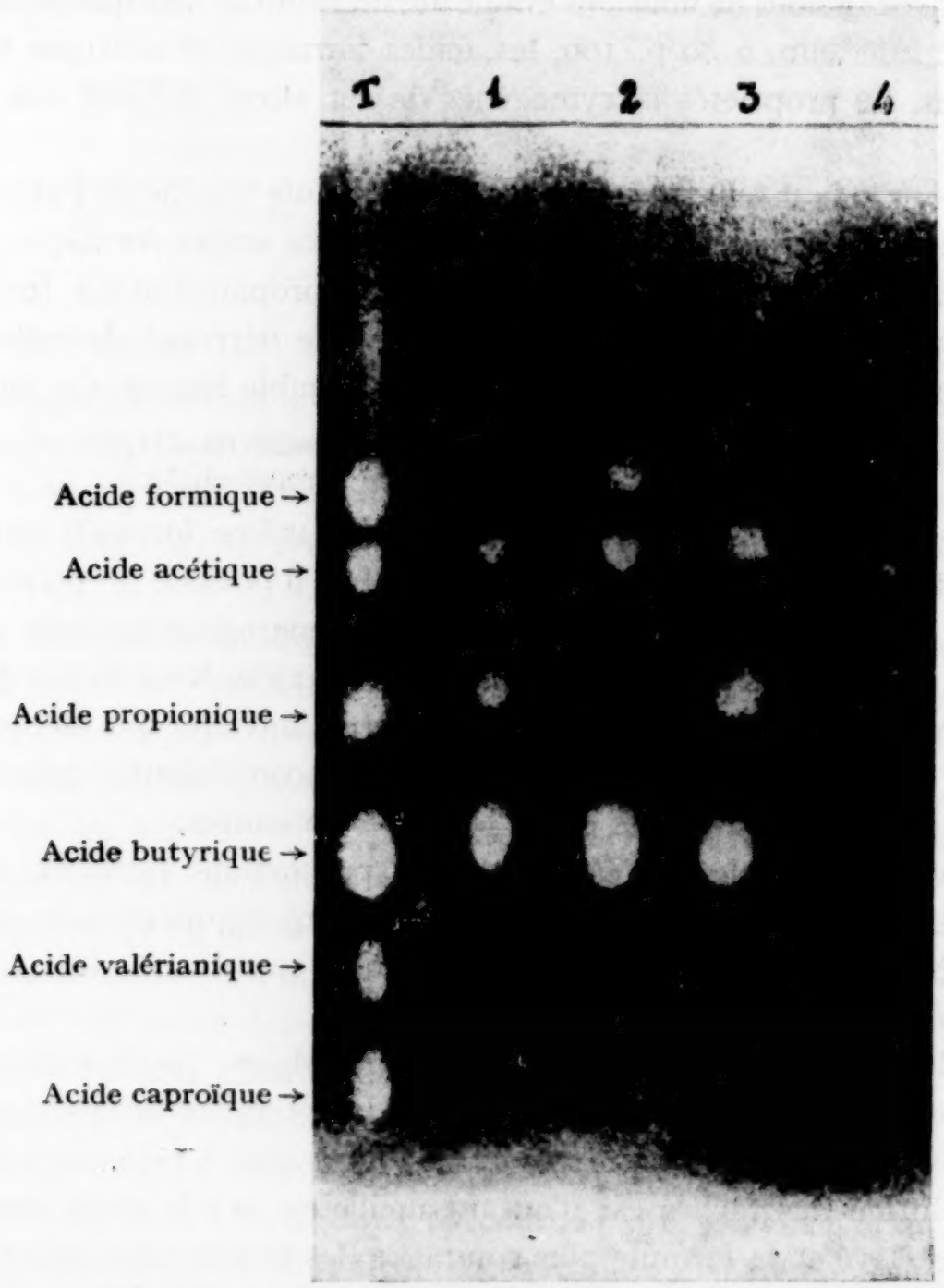


Fig. 1. Chromatographie des acides volatils des milieux de culture de bactéries anaérobies (Milieu V.F. glucosé à 1 p. 100; essai sur 30 ml). T: mélange témoin; — 1: *Fusiformis hemolyticus*; 2. *Fusiformis fusiformis*; 3. *Spherophorus funduliformis*; 4. *Ristella convexa*.

parasites. KENNEDY ET BARKER[34] avaient observé cette anomalie et recommandaient de laver le papier-filtre avec une solution d'oxalate de potassium, avant la chromatographie avec le solvant alcool–ammoniaque.

Bibliographie p. 84/85.

Les alcools supérieurs donnent des taches bien nettes. Les R_F des acides décroissent quand le poids moléculaire des alcools augmente. Les R_F sont plus grands pour les alcools de la série normale que pour leurs isomères ramifiés.

c. L'essai des solvants organiques classiques: cétones; dérivés chlorés, bromés, soufrés des hydrocarbures; esters; ne nous a permis aucune séparation intéressante.

d. L'alcool allylique (Δ^1-propénol) sépare convenablement les acides formique et acétique. Le solvant est composé d'alcool allylique, d'eau et d'ammoniaque concentrée (100:5:1). Les R_F obtenus pour les acides formique et acétique sont respectivement 0.45 et 0.52. Les acides valérianique et caproïque migrent avec le front et sont difficilement repérables. Les divers mélanges d'alcool allylique avec des solvants diminuant les R_F des acides ne nous ont donné aucun résultat; dès que la concentration en propénol est inférieure à 80 p. 100, les acides formique et acétique ne sont plus séparés. De plus, les propriétés lacrymogènes de cet alcool rendent son emploi très pénible.

e. Nous avons cherché si, parmi les corps de formule voisine de l'alcool allylique, certains ne présentaient pas la propriété de séparer les acides formique et acétique. Nous avons obtenu un résultat favorable avec le propanediol-1,2 (ou propylèneglycol), dont la formule peut être considérée comme dérivant de celle de l'alcool allylique par fixation des éléments de l'eau sur la double liaison. Ce solvant sépare

$CH_2=CH-CH_2OH$ — Δ^1-Propénol

$CH_3-CHOH-CH_2OH$ — Propanediol-1,2

très correctement les deux premiers acides volatils, même lorsqu'il se trouve à la concentration de 10 p. 100 dans la phase mobile. Mais il possède un point d'ébullition élevé (188° C), d'où l'impossibilité de sécher le chromatogramme sans éliminer les acides; d'autre part, la migration des acides est très rapide. Nous avons donc cherché à diluer convenablement le propanediol avec d'autres solvants qui lui conserveraient ses avantages, en diminuant ou supprimant ses inconvénients; pour choisir ces solvants, nous avons dégagé de nos essais les règles suivantes:

1. Les solvants miscibles à l'eau en toutes proportions (éthanol, propanediol) font migrer très rapidement les acides; les taches sont régulièrement espacées mais tassées vers le bas du chromatogramme; l'eau ajoutée au solvant a la même propriété et les R_F sont fonction de la quantité d'eau ajoutée.

2. Les solvants hydrophobes ou peu hydrophiles (hydrocarbures, alcools supérieurs) ralentissent la vitesse de migration; les premiers acides sont largement espacés, mais, à partir de l'acide butyrique, les taches sont à peine séparées.

3. La résolution des taches est d'autant meilleure que le poids moléculaire du solvant est plus élevé et sa formule plus complexe (les taches deviennent plus ramassées et plus nettes quand on passe du méthanol au butanol, l'alcool butylique tertiaire donnant la meilleure résolution).

4. L'addition d'un liquide volatil au propanediol était indispensable afin de permettre un séchage partiel du chromatogramme. Nous avons essayé le benzène et le cyclohexane: ceux-ci influencent assez peu la vitesse de migration des acides et ont l'inconvénient de mal séparer les acides butyrique, valérianique et caproïque

Bibliographie p. 84/85.

TABLEAU III

(Les proportions sont indiquées en volume)

Solvant I		*Solvant II*		*Solvant III*	
Benzène	30	Alcool benzylique	30	Butanol	30
Propylèneglycol	10	Cyclohexane	10	Cyclohexane	30
Isopropanol	20	Propylèneglycol	10	Propylèneglycol	10
Ammoniaque 22° Bé	0.6	Isopropanol	20	Ammoniaque 22° Bé	0.07
Eau	3	Ammoniaque 22° Bé	0.7	Morpholine	0.5
		Morpholine	0.07	Eau	3.7
		Eau	3.5		

Valeurs des R_F

	Solvant I	*Solvant II*	*Solvant III*
Ac. formique	0.41	0.23	0.29
Ac. acétique	0.50	0.29	0.36
Ac. propionique	0.59	0.40	0.49
Ac. butyrique	0.68	0.52	0.62
Ac. valérianique	0.74	0.58	0.70
Ac. caproïque	0.79	0.66	0.80

(Solvant I du Tableau III). Par adjonction d'un solvant ralentissant fortement la vitesse de migration (alcool benzylique), nous avons obtenu des R_F plus faibles, mais une mauvaise séparation des acides supérieurs (Solvant II). Enfin l'addition de butanol nous a permis d'obtenir un espacement homogène entre les taches acides (Solvant III) (voir Fig. 1). Aussi est-ce à ce dernier solvant que nous avons donné la préférence.

f. Dans la série aromatique, l'alcool benzylique nous a permis de séparer les acides de la série "*iso*" de ceux de la série normale. Nous nous sommes inspirés de la technique décrite par CONSDEN, GORDON ET MARTIN[44] pour la séparation de la leucine et de l'*iso*leucine. L'alcool benzylique saturé d'ammoniaque 1,5 *N* fait migrer très lentement les acides (après 24 heures de chromatographie descendante, tous les acides sont encore confondus en une tache étirée, dont la base a pour R_F 0.2 environ). Mais lorsqu'on laisse couler le solvant durant trois ou quatre jours, le front dépassant largement le bord inférieur du papier, découpé en dents de scie, on observe une séparation très nette des acides, dont les R_F sont les suivants, celui de l'acide valérianique étant pris comme unité: acide formique 0.17; acide acétique 0.20; acide proprionique 0.36; acide *iso*butyrique 0.51; acide butyrique 0.61; acide *iso*-valérianique 0.82; acide valérianique 1 (voir Fig. 2). Le R_F de l'acide valérianique est arbitrairement fixé à 1, la distance parcourue par le solvant n'étant pas mesurable. Le point d'ébullition élevé de l'alcool benzylique (205° C) empêche le séchage du chromatogramme. A froid, il est impossible d'obtenir la dessication; à l'étuve, les acides se volatilisent en même temps que l'alcool benzylique. Le chromatogramme doit donc être révélé alors qu'il est encore imprégné du solvant. Celui-ci donne au papier une apparence huileuse et les taches doivent être examinées par transparence. Il est nécessaire de les entourer d'un trait de crayon immédiatement, car, sous l'influence de l'excès de liquide révélateur pulvérisé, elles tendent à s'élargir rapidement.

Bibliographie p. 84/85.

Par mélange avec un autre solvant, même en quantité très faible, l'alcool benzylique perd sa propriété de séparer les acides "*iso*" des acides de la série normale. Aucune autre phase mobile ne nous a donné ces séparations. *Nous avons donc, malgré ses inconvénients, retenu l'alcool benzylique pour la chromatographie sur papier des acides "iso"*. L'utilisation de ce solvant sur colonne permettrait sans doute la séparation et le dosage de tous les acides aliphatiques de C_1 à C_6 et de leurs isomères.

(2) *Choix de la base saturant les acides*

La base utilisée et sa concentration font varier considérablement le R_F: il semble qu'agissent à la fois le coefficient de dissociation et l'hydrophilie de la base. Les bases

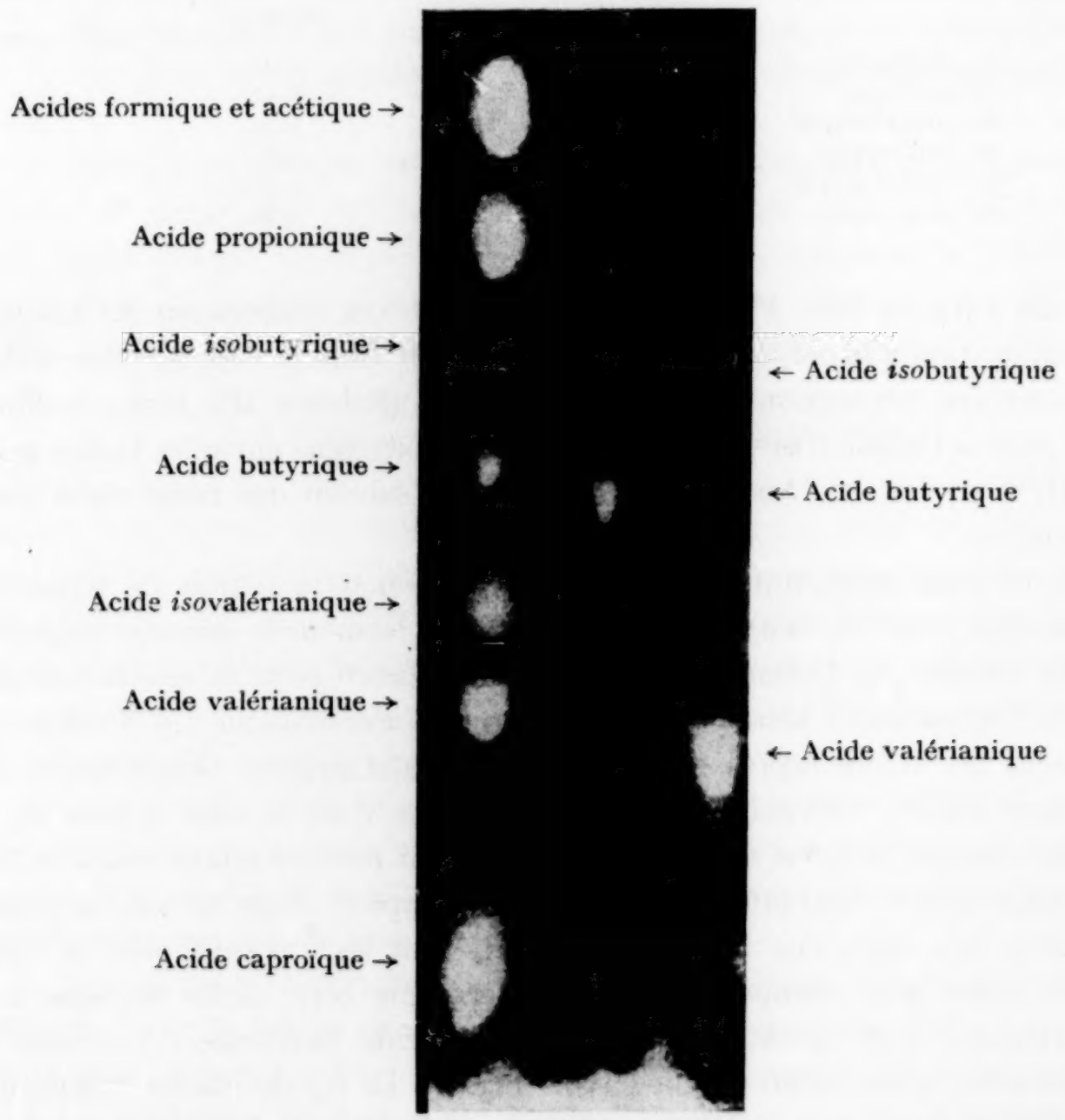


Fig. 2. Chromatographie des acides volatils de la série *iso* dans le solvant alcool benzylique/ammoniaque. On remarquera la diminution des R_F dans le mélange, par rapport aux acides isolés.

organiques faibles et miscibles en toutes proportions à l'eau se comportent comme l'ammoniaque.

Nous avons tenté de remplacer l'ammoniaque par une autre base. En effet, les sels d'ammonium sont instables (sels d'acides faibles et d'une base peu ionisée) et les deux composants dissociés sont très volatils, ce qui entraîne leur disparition

Bibliographie p. 84/85.

lors du séchage du papier. Cet inconvénient se manifeste à deux moments de la chromatographie: a. lors du dépôt des taches de départ, il est impossible de sécher celles-ci avec de l'air chaud: par séchage à froid d'une durée n'excédant pas une heure, les pertes d'acides sont très faibles; b. lors du séchage du chromatogramme, avant la pulvérisation, les pertes en acide sont très sensibles et dépendent du solvant utilisé; en particulier, les solvants peu volatils entraînent les acides en quantité considérable.

Il fallait donc remplacer l'ammoniaque par une base moins volatile et plus dissociée, mais néanmoins suffisamment faible pour ne pas gêner la révélation. Parmi les substances essayées, la *morpholine*, $(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2$ (O) est peu volatile (E = 126° C), elle est plus forte que l'ammoniaque et elle ne gêne pas la révélation. Après 3 heures de séchage à la temperature du laboratoire, en présence du solvant II, 5 p. 100 seulement des acides acétique et propionique ont disparu et l'on retrouve intégralement les autres acides.

Nous avons donc introduit la morpholine dans les solvants II et III, mais en conservant l'ammoniaque, qui permet une bonne saturation de l'atmosphère de la cuve, ce qui ne peut être obtenu avec la morpholine seule.

(c) *Révélation*

Les techniques de révélation qui ont éte proposées sont de trois types:

(1) *Pulvérisation d'un indicateur virant à pH bas, tamponné par de l'acide citrique* (HISCOX ET BERRIDGE[28], KENNEDY ET BARKER[34]).

Les acides chromatographiés retiennent l'ammoniaque à leur niveau: leurs taches sont donc alcalines sur le fond acide du papier. La coloration disparaît rapidement par départ de l'ammoniaque, et la révélation ne peut être, même grossièrement, quantitative.

(2) *Pulvérisation d'un indicateur virant à pH neutre ou alcalin, préalablement neutralisé exactement par de la soude*

La coloration est très labile, la soude étant rapidement neutralisée par le CO_2 de l'air (BROWN ET HALL[27]); nous avons vu que ISHERWOOD ET HANES[39] évitaient cet inconvénient en effectuant la pulvérisation dans une enceinte privée de gaz carbonique, ce qui complique sensiblement le mode opératoire. REID ET LEDERER[35] pulvérisent un indicateur additionné de formol: l'ammoniaque du papier est alors dissimulée et on colore le fond par l'action ménagée de vapeurs ammoniacales.

(3) *Emploi d'une réaction chimique s'effectuant à un pH déterminé*

On a eu recours notamment à la réduction du nitrate d'argent ammoniacal (*cf.* ISHERWOOD ET HANES[39]): les substances réductrices naturelles du papier colorent le fond en brun foncé,grâce à l'alcalinité du nitrate d'argent ammoniacal; la réduction n'a pas lieu au niveau des taches acides qui apparaissent en blanc sur fond marron;

Bibliographie p. 84/85.

la teinte du papier s'approfondit si on pulvérise ensuite une solution diluée de glucose et que l'on sèche le chromatogramme. L'acide formique a un comportement particulier: comme il est lui-même réducteur, sa tache vire immédiatement au marron foncé, réaction qui s'avère très utile pour le distinguer de façon spécifique des autres acides volatils, surtout de l'acide acétique. BÖRJE ET TORSTEN[32] ont voulu en faire une réaction de différenciation des acides formique, acétique et lactique, mais elle n'est valable que pour l'acide formique, les acides acétique et lactique ne pouvant être séparés.

(4) *Procédé adopté*

Parmi les indicateurs colorés, ceux dont le point de virage se situe entre 7.5 et 9 nous ont donné les meilleurs résultats. Nous avons choisi le rouge de crésol (*o*-crésol-sulfone-phtaléine), dont la couleur est jaune en milieu acide et vire au rouge à pH 8. Cet indicateur, additionné de soude, donne un contraste net entre les taches acides jaunes et le fond du papier rouge. La coloration rouge disparaît en quelques minutes par action du CO_2 de l'air. Nous avons donc ajouté un tampon alcalin, moins sensible au CO_2: une solution de phosphate ajustée à pH 9.5 permet d'obtenir des taches persistantes; cependant, l'obligation dans ce cas de pulvériser une solution aqueuse entraîne la diffusion des taches, et le véronal sodique, soluble dans l'alcool, évite cet inconvénient.

La formule de la *solution d'indicateur* est la suivante: *o*-crésol-sulfone-phtaléine: 0.2 g; soude *N*/1: 0.3 ml; eau: 15 ml; après dissolution, ajouter 70 ml d'alcool à 96°. La *solution tampon* est composée d'une solution aqueuse de véronal sodique à 10 g pour 100 ml d'eau, à laquelle on ajoute 150 ml d'alcool à 96°. Les deux solutions sont mélangées avant l'emploi en proportions variables selon la base utilisée pour la chromatographie. Avec une phase mobile ammoniacale, on pulvérise un mélange à parties égales des deux solutions. Si la phase mobile contient de la morpholine, on fait un mélange contenant $\frac{1}{4}$ de la solution tampon pour $\frac{3}{4}$ de la solution indicatrice.

Cette technique de révélation nous a donné des résultats constants: elle met en évidence toutes les substances qui communiquent au papier un pH inférieur à la neutralité; la coloration ne disparaît qu'après 48 heures environ.

(*d*) *Nature du papier*

Lors de nos essais préliminaires nous avons employé le papier Whatman no. 1, qu est relativement lent et qui permet de déceler de petites quantités d'acides, de l'ordre de 0.025 micromolécules. Pour les applications pratiques de la technique, nous avons préféré le papier Whatman no. 3, dont l'épaisseur permet de déposer des quantités de liquide plus importantes à la tache de départ. Après révélation, les taches sont plus nettes et la coloration disparaît plus lentement.

(*e*) *Mode opératoire*

Les considérations précédentes nous conduisent à résumer la technique de chromatographie des acides volatils de la façon suivante:

Bibliographie p. 84/85.

1. Le papier utilisé est le Whatman no. 3; la chromatographie est effectuée en phase descendante.

2. Les acides sont déposés sur le papier sous forme de leurs sels de morpholine, par fractions de 5 μl, à l'aide d'une micropipette; entre chaque addition, on laisse sécher la tache à la température du laboratoire. La quantité d'acide déposée doit être comprise entre 0.5 et 3 μM, et le volume de solution utilisé compris entre 5 et 20 μl.

3. Dès que les taches de départ sont sèches, on effectue la chromatographie à l'aide du solvant III durant 24 heures pour les acides de la série normale; pour la séparation des acides de la série normale et de la série "*iso*", on emploie l'alcool benzylique saturé d'ammoniaque 1.5 N; on laisse couler ce solvant durant quatre jours, le bord inférieur du papier étant découpé en dents de scie pour permettre un écoulement homogène.

4. Les feuilles sont retirées de la cuve à chromatographie et laissées 20 minutes à la température du laboratoire ou 10 minutes à 50° C. L'indicateur tamponné est ensuite pulvérisé; la technique suivante nous a donné les meilleurs résultats; d'abord, pulvérisation homogène mais légère sur une face, jusqu'à l'apparition des taches jaunes sur un fond jaune orangé; ensuite, sur l'autre face, pulvérisation jusqu'à obtention d'un fond rouge violacé. Après 5 minutes, on examine les taches par transparence et on les entoure d'un trait de crayon. Lors de l'emploi du solvant alcool benzylique/ammoniaque, le chromatogramme peut être séché à la température du laboratoire durant 45 minutes. Après pulvérisation, il faut attendre 10 minutes environ avant que les taches deviennent bien visibles; elles sont alors marquées immédiatement; elles persistent 48 heures environ, mais en s'agrandissant considérablement par diffusion dans le papier humide, le fond du papier se décolorant peu à peu.

Il est possible de déceler par cette technique 0.05 μM d'acide formique; 0.1 μM des acides acétique, propionique, butyrique, et 0.15 μM des acides valérianique et caproïque. Les acides minéraux (en particulier l'acide sulfurique), qui peuvent avoir été entraînés lors de la distillation des acides volatils, restent à la tache de départ. L'acide lactique se place entre les acides formique et acétique: son R_F est variable et dépend de la présence de ces acides; s'il gêne la lecture du chromatogramme, il est facile de procéder à un nouvel entraînement à la vapeur à partir de la solution des acides volatils obtenue précédemment.

CONCLUSION

Nous avons effectué au moyen de la technique précédente plus de 1000 séparations d'acides volatils et nous avons obtenu des résultats constants et aisément reproductibles. Le procédé est bien adapté à des déterminations en série, particulièrement dans certaines études métaboliques, comme par exemple l'exploration systématique du type fermentaire des bactéries anaérobies (GUILLAUME, BEERENS ET OSTEUX[45]) (voir Fig. 1). La rapidité d'exécution et la simplicité des moyens mis en œuvre sont

Bibliographie p. 84/85.

les principaux avantages de la méthode, dont la fidélité nous a donné d'autre part entière satisfaction.

RÉSUMÉ

La chromatographie sur papier des acides aliphatiques volatils de C_1 à C_6 est réalisée après entraînement à la vapeur dans des conditions bien déterminées, élimination des cations et concentration par des résines sulfonées. Les acides sont transformés en sels de morpholine et chromatographiés sur papier Whatman No. 3 dans le solvant butanol/cyclohexane/propylène-glycol/ammoniaque à 22° Bé/morpholine/eau (30:30:10:0.7:0.07:3.5) pour la séparation des acides de la série normale, et dans le solvant alcool benzylique saturé d'ammoniaque 1.5 *N* pour ceux de la série "iso"; révélation par une solution alcoolique d'*o*-crésol-sulfone-phtaléine, tamponnée par le véronal sodique. Le procédé a donné d'excellents résultats, notamment dans la détermination des types fermentaires des bactéries anaérobies.

SUMMARY

The volatile aliphatic acids from C_1 to C_6 are chromatographed on paper after recovery by steam distillation under controlled conditions, elimination of cations and concentration by passage over a sulfonated resin. The acids are transformed into their morpholine salts and chromatographed on Whatman No. 3 paper in the solvent-system butanol/cyclohexane/propylene glycol/ammonia 22° Bé/morpholine/water (30:30:10:0.7:0.07:3.5) for the separation of the straight chain acids, and in the system benzyl alcohol saturated with 1.5 *N* ammonia for the "iso" series. Revelation is carried out by spraying with an alcoholic solution of *o*-cresolsulfonphthalein in sodium veronal buffer. The method has given excellent results, notably in the determination of the fermentation type or pattern of anaerobic bacteria.

BIBLIOGRAPHIE

[1] E. DUCLAUX, *Ann. Inst. Pasteur*, 9 (1895) 265.
[2] W. U. BEHRENS, *Z. anal. Chem.*, 69 (1926) 97.
[3] C. H. WERKMAN, *Ind. Eng. Chem.*, 2 (1930) 302.
[4] S. T. SCHICKTANZ, W. I. STEELE ET A. C. BLAISDELL, *Ind. Eng. Chem.*, 12 (1940) 320.
[5] E. LESTER-SMITH, *Biochem. J.*, 36 (1942) xxii.
[6] S. R. ELSDEN, *Biochem. J.*, 40 (1946) 258.
[7] T. E. FRIEDEMANN, *J. Biol. Chem.*, 123 (1938) 161.
[8] L. L. RAMSEY ET W. I. PATTERSON, *J. Assoc. Off. Agr. Chem.*, 28 (1945) 644 (voir aussi: *id.*, 29 (1946) 337 et 31 (1948) 441).
[9] H. J. NIJKAMP, *Anal. Chim. Acta*, 5 (1951) 325.
[10] V. L. KRETOVITCH, T. V. DROZDOVA ET I. S. PETROVA, *Doklady Akad. Nauk. SSSR*, 80 (1951) 409.
[11] A. C. NEISH, *Canad. J. Research*, 27B (1949) 6.
[12] H. J. NIJKAMP, *Chem. Weekblad*, 45 (1949) 480.
[13] R. L. M. SYNGE, *Analyst*, 71 (1946) 256.
[14] V. MOYLE, E. BALDWIN ET R. SCARISBRICK, *Biochem. J.*, 42 (1948) xiv; 43 (1948) 308.
[15] M. H. PETERSON ET M. J. JOHNSON, *J. Biol. Chem.*, 147 (1948) 775.
[16] L. L. RAMSEY, *J. Assoc. Off. Agr. Chem.*, 31 (1948) 164.
[17] E. BUEDING ET H. W. YALE, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 411.
[18] F. V. GRAY, A. F. PILGRIM, H. J. RODDA ET R. A. WELLER, *Nature*, 167 (1951) 954.
[19] A. T. JAMES ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 50 (1952) 679.
[20] E. F. ANNISON, *Biochem. J.*, 58 (1954) 671.
[21] J. H. VAN DE KAMER, K. W. GERRITSMA ET E. J. WANSINK, *Biochem. J.*, 61 (1955) 174.
[22] K. FINK et R. M. FINK, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 70 (1949) 654.
[23] Y. INOUE ET M. J. NODA, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 18 (1950) 294.
[24] A. R. THOMPSON, *Australian J. Sci. Research*, B4 (1951) 180.
[25] E. R. STADTMAN ET H. A. BARKER, *J. Biol. Chem.*, 184 (1950) 769.
[26] K. SATAKE ET T. SEKI, *J. Japan. Chem.*, 4 (1950) 557.
[27] F. BROWN ET L. P. HALL, *Nature*, 166 (1950) 66.
[28] E. R. HISCOX ET N. J. BERRIDGE, *Nature*, 166 (1950) 522.
[29] A. I. VIRTANEN ET J. K. MIETTINEN, *Nature*, 168 (1951) 294.
[30] A. G. LONG, J. R. QUAYLE ET R. J. STEDMAN, *J. Chem. Soc.*, (1951) 2197.
[31] A. R. JONES, E. J. DOWLING ET W. J. SKRABA, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 394.
[32] L. BÖRJE ET S. TORSTEN, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 87.
[33] H. S. BURTON, *Nature*, 173 (1954) 127.

[34] E. P. KENNEDY ET H. A. BARKER, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1033.
[35] R. L. REID ET M. LEDERER, *Biochem. J.*, 50 (1951) 60.
[36] J. JACQUET ET O. VILLETTE, *74ème Congrès de l'Ass. Franc. pour l'Avancement des Sciences, Caen, 1955*.
[37] R. MUNIER, *Bull. Soc. Chim.*, (1952) 869.
[38] R. E. B. DUNCAN ET J. W. PORTEOUS, *Analyst*, 78 (1953) 641.
[39] F. A. ISHERWOOD ET C. S. HANES, *Biochem. J.*, 55 (1953) 824.
[40] J. GUILLAUME ET R. OSTEUX, *Compt. rend.*, 241 (1955) 501.
[41] D. C. DYER, *J. Biol. Chem.*, 28 (1916-1917), 445.
[42] W. H. OLMSTED, C. W. DUDEN, W. N. WHITAKER ET R. F. PARKER, *J. Biol. Chem.*, 85 (1929–1930), 114.
[43] E. J. WITZEMANN, *J. Am. Chem. Soc.*, 41 (1919) 1946.
[44] R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
[45] J. GUILLAUME, H. BEERENS ET R. OSTEUX, *Ann. Inst. Pasteur*, 90 (1956) 229.

Reçu le 3 juillet 1957

THE PAPER ELECTROPHORETIC SEPARATION OF RARE EARTHS USING 1% CITRIC ACID AS ELECTROLYTE

M. LEDERER
Institut du Radium, Laboratoire Curie, Paris (France)

In a preliminary note[1] we have described the separation of several mixtures of rare earths using 1 % citric acid as electrolyte. The study of all the rare earths was not possible at that time because of two technical difficulties: the technique employed (DURRUM technique with paper strips holding one sample only) did not permit the measurement of comparative mobilities, which is important when two ions do not separate, and we did not dispose of a complete collection of rare earth elements.

In spite of these limitations we employed paper electrophoresis to separate the mixture Nd–Pm–Sm[2] and to prepare Ac free from La by a continuous method[3].

Recently we have obtained an apparatus which allows the comparison of the movement of several spots run side by side thus permitting the examination of rare earths which do not move with very different speeds. Also we have been able to obtain a complete collection of rare earth oxides from Johnson, Matthey & Co. (London) varying in purity from 95 % to 99 %.

This paper is thus a continuation of the studies previously described[1–3]. Relatively few separations of yttrium earths were found possible under the conditions employed.

TECHNIQUE

The large model paper electrophoresis apparatus of Jouan (Paris) was used holding a paper sheet 25 cm long and 28 cm wide in a horizontal moist chamber. The paper used was No. 302 d'Arches. Sheets of the required dimensions for the apparatus were dipped into 1 % citric acid solution, blotted between filter papers and clamped into the apparatus which contained 400 ml of 1 % citric acid in each electrode chamber.

300 volt were applied for 3 ½ hours with a current of initially 6 ma which rose usually to 10–11 ma.

The rare earth oxides were dissolved in 1 *N* HNO_3 and precipitated with 1 *N* NH_4OH. The hydroxides were filtered off, washed twice with distilled water and transferred back to the original beaker and dissolved in sufficient 1 % citirc acid to produce a clear solution (with warming on the water bath). Under these conditions all rare earths except Ce give colourless solutions. Ce produces a yellow solution.

5 microlitres of the rare earth solution are then placed on the paper which had been mounted in the electrophoresis apparatus beforehand. The spots were placed about 3 cm from the anode end.

After electrophoresis the paper is blotted to remove excess liquid and dipped

References p. 89.

into an alcoholic ammoniacal hydroxyquinoline solution. The paper is then viewed both in daylight and ultraviolet light.

To test the uniformity of the migration of spots placed next to each other on the paper, a mixture of La and Y was prepared and five spots placed next to each other allowing 8 cm on each side and 3 cm between the spots. The movement of La after 2½ hours with 300 volt was 110, 110, 107, 106 and 105 mm (average 107.6) and that of Y 96, 97, 96, 95, 95 (average 95.8 mm); in both cases the variation being about 2%–3% of the total distance.

RESULTS

To minimise differences due to variations from one sheet to another as many rare earths as possible were placed on the same sheet in mixtures of two or three per spot. On the first sheet used to compare all lanthanum earths the following solutions were run side by side: Pr alone; Eu and Ce; Sm, Nd and La, two spots of each solution being placed on the paper. The distances moved in mm were:

La	137, 138
Ce	120, 122
Pr	115, 117
Nd	112, 113
Sm	100, 101
Eu	96, 97

The distances measured were those of the centres of the spots; the two values being the distances of duplicate analyses on the same sheet. Fig. 1 shows the size of spots and degree of separation obtained.

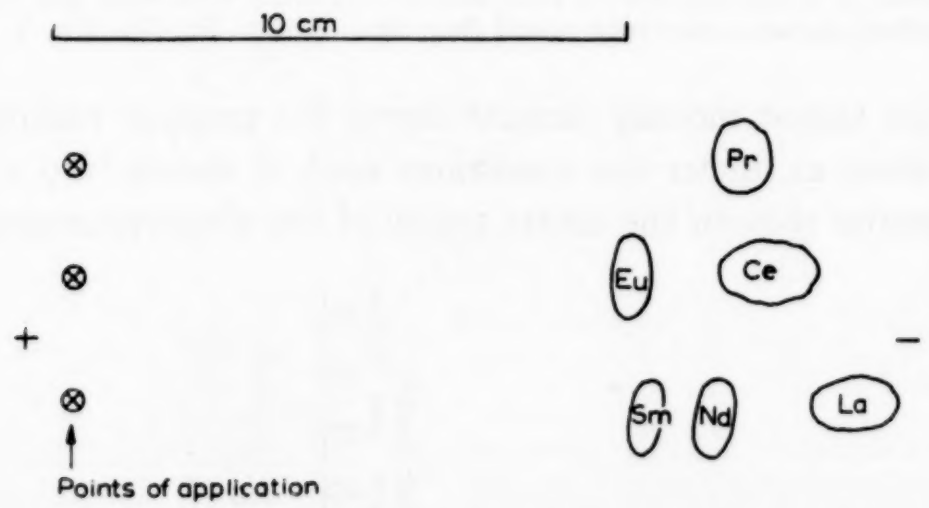


Fig. 1. Movement of lanthanum earths in 1% citric acid with 300 volts for 3½ hours. The following solutions were electrophorised (top to bottom): Pr, Eu–Ce, Sm–Nd–La.

Three spots of the mixture Sm–Nd–La were also run side by side on another sheet and moved as follows:

La	133, 136, 135
Nd	109, 109, 111
Sm	100, 99, 101

References p. 89.

Eu, Gd and Tb were compared on one sheet and moved

Eu	106, 106 mm
Gd	104, 103
Tb	103

For establishing the sequence of the yttrium earths three sheets were run holding mixtures of lower and higher atomic weight earths as well as La as reference. The distances moved varied somewhat from one sheet to another and are given below.

(1)		(2)		(3)	
La	161, 162 mm	La	155, 158 mm	La	161, 156, 161, 156 mm
Gd	117, 117	Gd	118, 120	Ce	140, 141
Dy	114, 113	Tb	115, 115	Y	122, 125
Ho	111, 113	Dy	117, 116, 113		
Tm	106, 105	Yb	104, 105	Er	110, 112, 109
Lu	102, 102	Lu	106, 105, 102	Yb	99, 101

Fig. 2 shows the separations obtained on sheet 3.

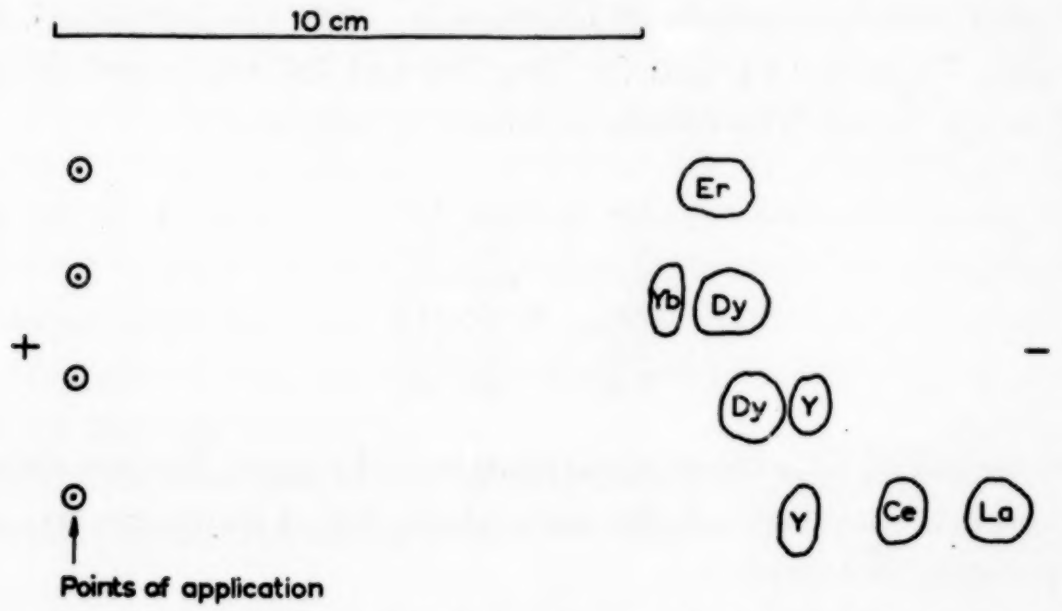


Fig. 2. The movement of some rare earths mixtures in 1 % citric acid with 300 volts for 3½ hours. The following solutions were electrophorised (top to bottom): Er, Dy–Yb, Y–Dy, La–Ce–Y.

La being the fastest moving element shows the greatest variation of mobility from sheet to sheet as, under the conditions used, it moves into a zone in which liquid flow is greater than in the centre region of the electropherogram. In order to

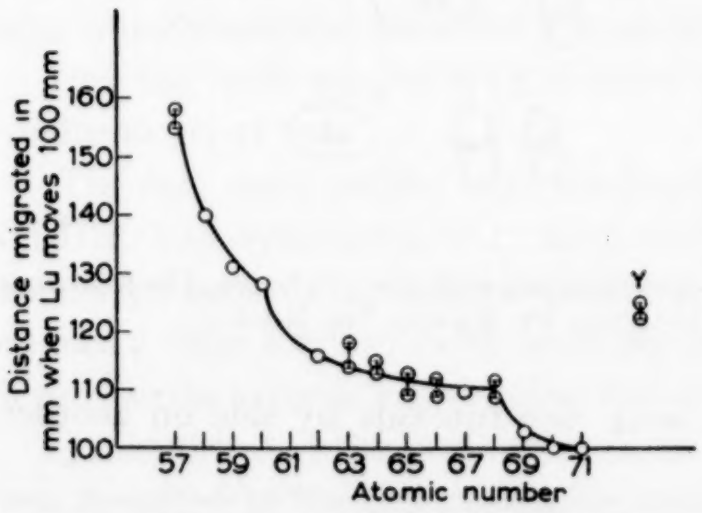


Fig. 3. Relative electrophoretic mobilities plotted against atomic numbers.

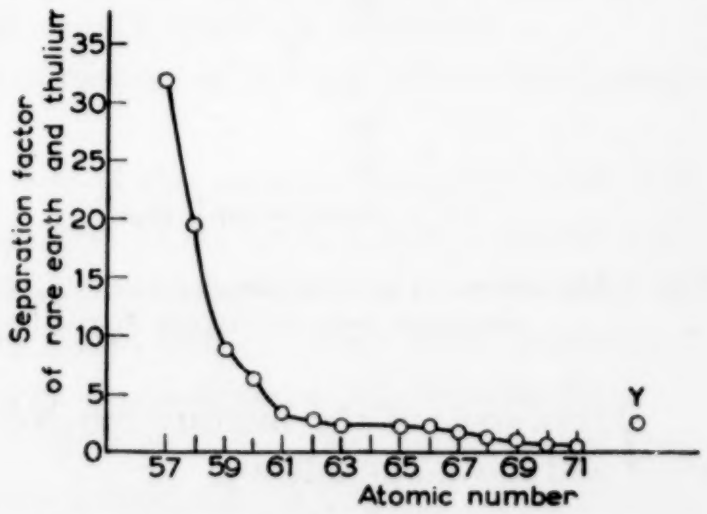


Fig. 4. Ion exchange separation factors (compared with Tm) of a glycolic acid elution. (From STEWART[4].)

References p. 89.

compare mobilities from one sheet to another we referred always to the slowest moving rare earth. Lu and Yb move with practically the same speeds and all mobilities were recalculated to a movement of 100 mm for Lu and Yb.

Fig. 3 shows the mobilities plotted against the atomic numbers of the rare earths. Similar relative data exist for ion exchange sequences with glycolic acid elution (STEWART[4]). These are shown in Fig. 4. The agreement between the two seems to be rather good, except for the position of Y which moves much faster than in the ion exchange sequence.

SUMMARY

All rare earths have been electrophorised in 1% citric acid on paper with 300 volt for 3½ hours. The sequence is similar to that on ion exchange columns. Few separations of yttrium earths were recorded.

REFERENCES

[1] M. LEDERER, *Compt. rend.*, 236 (1953) 200.
[2] H. LANGEVIN-JOLIOT AND M. LEDERER, *J. Phys. Radium*, 17 (1956) 497.
[3] M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 11 (1954) 145.
[4] D. C. STEWART, *Peaceful Uses of Atomic Energy Conference (Geneva 1955)*, Vol. VII, p. 373.

Received March 30th, 1957

SHORT COMMUNICATIONS

A note on the detection of sulphate ions on paper chromatograms

The detection of substances on paper chromatograms requires a reaction which distinguishes the substance from the paper background. Usually colour reactions are employed, and when these do not exist a coloured spray which distinguishes background from substance is employed.

For sulphate ions no satisfactory reaction has so far been found, although one could be envisaged using a Ba^{++} spray followed by a colour reaction for the excess Ba^{++} on the background. The R_F values obtained by several authors in acid media were measured with radioactive $H_2{}^{35}SO_4$.

In this note we wish to describe a simple reaction for sulphates when these are developed in solvents containing HCl.

It was noticed that when the chromatogram was dried in an air oven black spots were formed wherever H_2SO_4 was left after the solvent had evaporated. This reaction is reliable if carried out as described in the experimental part and if the paper is viewed under ultraviolet light, it is sensitive to 5 γ of H_2SO_4 per spot.

Experimental

5 μl of the solution to be analysed are placed on Whatman No. 1 paper and developed by the ascending method with butanol–1 *N* HCl for 8 hours. The paper is then removed from the developing chamber and immediately placed in an air oven and dried at 105° C.

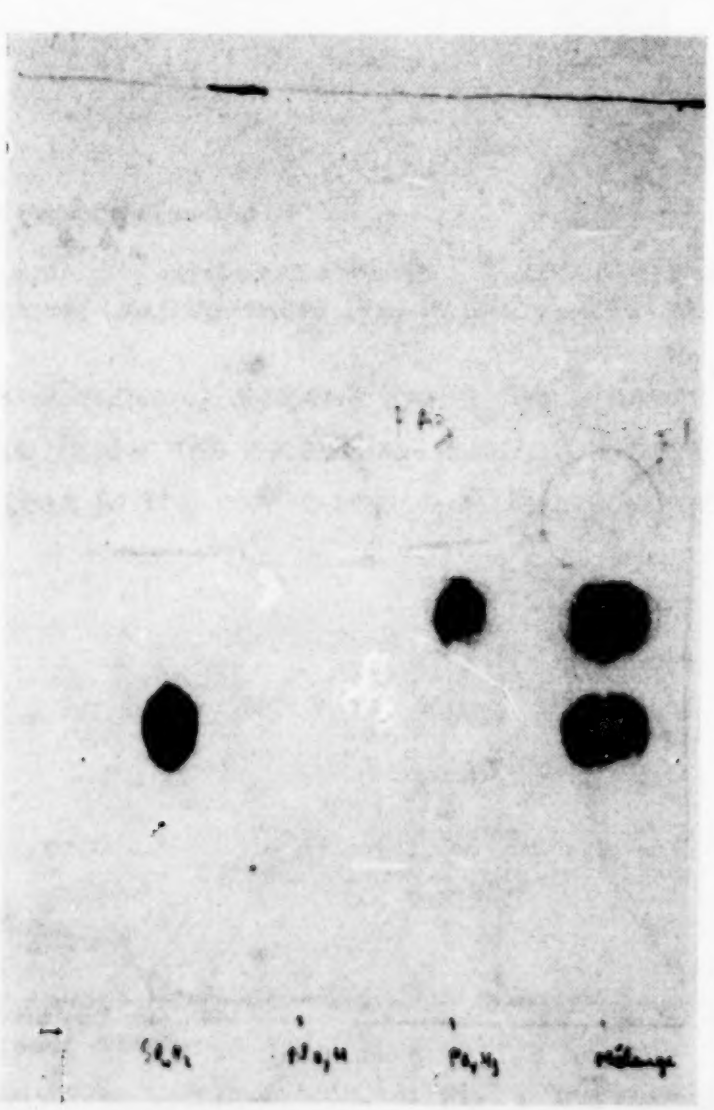


Fig. 1. A chromatogram developed with butanol–*N* HCl and heated for 10 min at 105°. From left to right: sulphuric acid, nitric acid, phosphoric acid, and a mixture of all three.

After the solvent has evaporated (approx. 10 min) sulphates form black spots. Fig. 1 shows a chromatogram thus treated. The spots from left to right are $N/10$ H_2SO_4, $N/10$ HNO_3, $N/10$ H_3PO_4 and a mixture of all three.

Phosphoric acid also produces a darkening and nitric acid a fluorescent spot in ultraviolet light. Both can, however, be distinguished by their R_F values from sulphate.

This reaction, simple as it seems, is, however, possible only under controlled conditions, and we shall enumerate the factors that may interfere.

The chromatogram may not be developed for more than 8 hours. Chromatograms that were left overnight, gave only a uniform darkening of the whole sheet. Likewise, chromatograms that were allowed to dry overnight also showed uniform darkening. In both cases the prolonged contact with HCl seems to produce considerable decomposition of the paper.

On the other hand the reaction works well, irrespective of whether an alkali sulphate, an alkaline earth sulphate, or free sulphuric acid, is chromatographed. In the case of the salts the cation stays in the region of the R_F 0–0.1 and thus cannot interfere with a reaction that seems to be that of free H_2SO_4.

The sensitivity was tested by making successive dilutions of sulphuric acid and running them on the same sheet. A dark spot is formed with as little as 20 γ but when the paper is held under ultaviolet light even 5 γ may still be detected as a fluorescent spot.

The fluorescence has been observed to fade with time, while the dark colour appears to be quite stable.

We believe that this reaction may be reliable in testing for sulphates.

Facultad de Quimica y Farmacia, Montevideo (Uruguay) JUAN ALBERTO COCH FRUGONI

Received October 3rd, 1957

Bemerkung zur Mikro-Jodbestimmung nach Bowden, Maclagan und Wilkinson

Nach dem von BOWDEN *et al.*[1] angegebenen Verfahren (Reaktion mit Cer(IV)Sulfat und arseniger Säure) lassen sich z.B. 0.01 mikrogramm KJ und 0.1 mikrogramm Thyroxin auf dem Papierchromatogramm erkennen und zwar als weisse Flecken auf hellgelbem Grund. Allerdings lassen sich Flecken, die von den angegebenen Substanzmengen herrühren, wegen des geringen Kontrastes nur schlecht photographieren.

Dem kann abgeholfen werden, indem man das Chromatogramm in Phenoldämpfe bringt, wodurch der gelbe Hintergrund hell- bis dunkelbraun wird, was die Flecken ausgezeichnet hervortreten lässt.

z.Z. Chemisches Institut der Universität, Marburg/Lahn (Deutschland) W. HÜLSEN

[1] C. H. BOWDEN, N. F. MACLAGAN UND J. H. WILKINSON, *Biochem. J.*, 59 (1955) 93.

Eingegangen den 3.Oktober 1957

NEW BOOKS

Chromatografia, edited by J. OPIENSKA-BLAUTH, A. WAKSMUNDZKI AND M. KANSKI (Panstwowe Wydawnictwe Naukowe, Warsaw 1957) (in Polish), 1083 pp. 25 chapters written by seventeen authors.
Contains an eight page dictionary of chromatographic terms in Polish, Russian, English and German.

Fundamentals of Chromatography, by H. G. CASSIDY (Interscience, New York, 1957), 447 pp.

Contents: Introduction, The Nature of Chromatography, The Molecular Interactions on Which Chromatographic Separations Rest, General Theory, Gas–Liquid Partition Chromatography, Column Partition Chromatography, Paper Partition Chromatography and Some Closely Related Methods, Adsorption Chromatography, Ion Exchange, Electron Exchange Polymers, Foam and Emulsion Fractionation, On Recognising and Evaluating Zones, On the Relation of R or R_F to Molecular Structure, On Choosing Mobile and Stationary Phases, On Using Chromatography, Appendix.

Inorganic Chromatography, by Z. TAMURA (Kyoritsu-Publishing Co. Ltd, Tokyo, 1957) (in Japanese), 59 pp.

This is a monograph written for first year students in analytical chemistry. It is well illustrated and contains many R_F tables and lists of reagents. 49 References.
(The editor thanks Prof. J. MATSUURA for this information).

Die Bluteiweisskörper des Menschen, Untersuchungsmethoden und deren klinisch-praktische Bedeutung. Dritte, völlig umgearbeitete Auflage, by F. WUHRMANN UND CH. WUNDERLY (Benno Schwabe & Co. Verlag, Basel/Stuttgart, 1957), 500 pp., 179 illustrations (12 in colour).
Contents: I. Chemie der Plasmaproteine, II. Eiweissreaktionen, III. Untersuchungsmethoden, IV. Klinisch-chemische Methoden, V. Klinische Bedeutung der Plasmaproteine.

Solvent Extraction in Analytical Chemistry, by GEORGE H. MORRISON AND HENRY FREISER (John Wiley & Sons, New York, 1957), 269 pp.
Contents: I. Principles of Solvent Extraction, II. Apparatus and General Techniques, III. Extraction Systems, IV. Separations.

Gas Chromatography, by A. I. M. KEULEMANS (Reinhold Publishing Corp., New York, 1957), 217 pp., numerous figures.
Contents: 1. The Chromatographic Methods–Gas Chromatography, 2. Straightforward Analytical Applications of Gas–Liquid Chromatography, 3. The Apparatus for Gas–Liquid Chromatography in Practice, 4. General Theory of Chromatographic Separations, 5. The Mobile Phase in Gas–Liquid Chromatography, 6. The Solid Support and the Stationary Liquid, 7. "Special" Applications of Gas–Liquid Chromatography, 8. Gas–Solid Chromatography.

VOL. 1 (1958) JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY 93

RECEIVED
APR 21 1958
ESSO TECHNICAL LIBRARY

ÜBERSICHT

HOCHVOLTELEKTROPHORESE

H. MICHL

II. Chemisches Institut der Universität, Wien (Österreich)

EINLEITUNG

Die Einführung der Papierchromatographie am Ende des zweiten Weltkrieges bedeutete einen enormen Fortschritt bei der Untersuchung niedermolekularer Stoffe. Jedoch erweckten die damals hier in Mitteleuropa vorhandenen Schwierigkeiten bei der Beschaffung geeigneter Papiere und Lösungsmittel, die langen Versuchszeiten und die schwer erkennbaren Zusammenhänge zwischen R_F Wert und chemischer Konstitution den Wunsch nach einem Verfahren, das diese Nachteile vermeidet und eine einigermassen vergleichbare Trennwirkung aufweist.

Die von WIELAND UND FISCHER[137,139] neuentdeckte Papierelektrophorese—als eigentlicher Erfinder gilt, wenn man von elektrokapillaranalytischen Verfahren[61] absieht, PAUL KÖNIG[65,66]—schien sich dafür zu eignen. Bei dieser Methode werden die verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten von Substanzen im elektrischen Feld zu ihrer Trennung ausgenützt. Ein Streifen Filtrierpapier dient dabei als Träger für das leitende Lösungsmittel und das Substanzgemisch, das durch den Einfluss des angelegten elektrischen Feldes in die einzelnen Komponenten zerteilt wird. Dieses Verfahren war sehr einfach und elegant. Mit einer Spannungsquelle, Elektroden, Filtrierpapier und zwei Glasplatten konnte man Stoffmengen von wenigen Mikrogramm untersuchen. Bei derartigen Anordnungen dauerten aber die Versuche mehrere Stunden bis Tage, da man nur mit Spannungsgefällen von etwa 2–10 V/cm arbeiten konnte; auch war die Trennschärfe für niedermolekulare Stoffe oft unbefriedigend. Beide Eigenschaften hängen, wie folgender vereinfachende Gedanke zeigt[79], eng zusammen: hat man z.B. auf einem Fleck von 0.5 cm Durchmesser zwei Substanzen aufgetragen und vergrössert sich dieser während der Versuchsdauer von 0.5 auf 1 cm, so muss man die Substanzen mindestens 1 cm weit auseinanderziehen, um eine Auftrennung erkennen zu können. Hält man nun die Versuchsdauer so kurz, dass keine Vergrösserung der Flecken eintritt, so genügt der halbe Weg oder man bekommt auf der gleichen Trennstrecke eine doppelt so gute Auftrennung. Da eine Vergrösserung der Flecken im genannten Ausmass bei niedermolekularen Stoffen schon innerhalb von 2 Stunden eintreten kann[69], ist eine Verbesserung der Trennschärfe nur bei deutlicher Steigerung der Wanderungsgeschwindigkeit zu erwarten. Nach dieser Überlegung müsste also eine drastische Erhöhung des Spannungsgefälles die gewünschte Verbesserung des Auflösungsvermögens mit sich bringen. Erhöht man aber bei der Elektrophorese das Spannungsgefälle, so steigt die Wanderungsgeschwindigkeit linear, die entwickelte Joulesche Wärme wächst aber mit dem Quadrat. Eine

Literatur S. 119/121.

möglichst gute Ableitung dieser Wärme ist deshalb eine unerlässliche Voraussetzung für Versuche mit höheren Spannungsgefällen. Die damals üblichen Geräte für Papierelektrophorese waren naturgemäss diesen Anforderungen nicht gewachsen und auch der Ausweg, die Pufferkonzentration und damit die Stromstärke und die Joulesche Wärme zu vermindern, ist nur in Ausnahmefällen gangbar[29,84,109]. Auch die Apparatur von BERRAZ[12], von der behauptet wurde[22,78], dass sie eine gewisse Ähnlichkeit mit der in Fig. 1 und 2 dargestellten Apparatur besässe, wäre mangels jeder Kühlvorrichtung

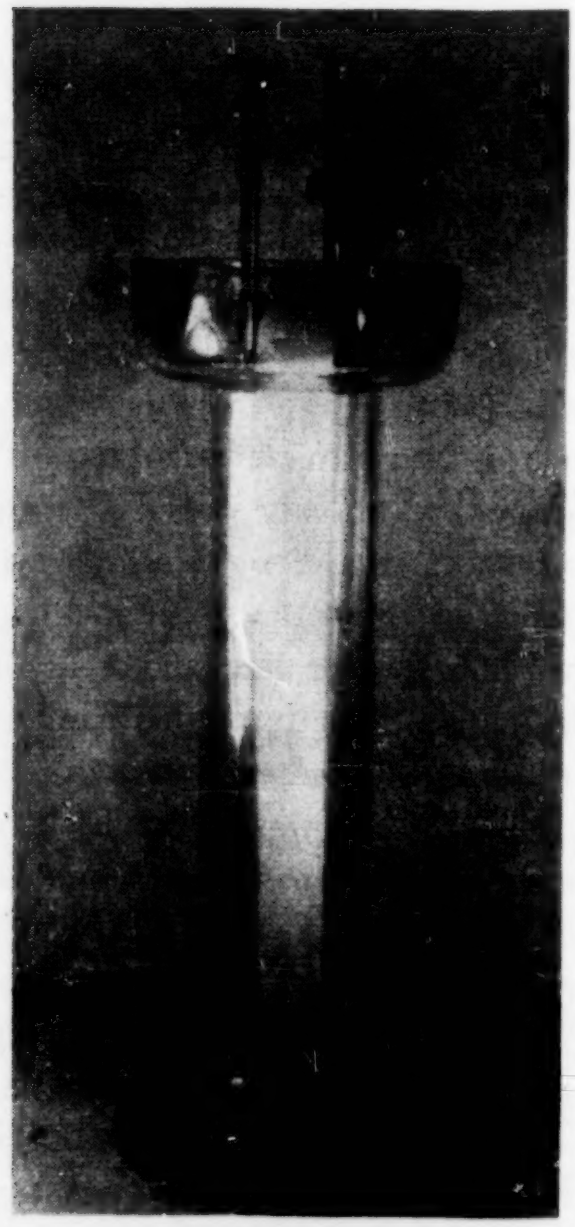


Fig. 1.

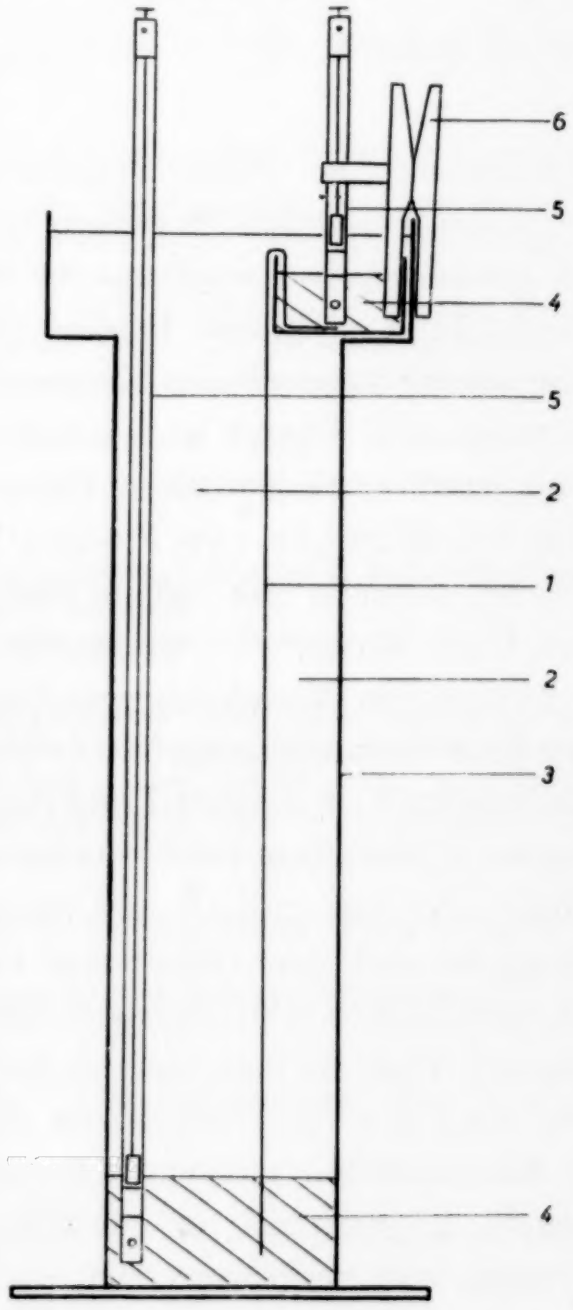


Fig. 2.

Fig. 2. 1. Filtrierpapierstreifen. 2. Organisches Lösungsmittel. 3. Glasgefäss. 4. Mit Zellulosepulver verdickter Puffer. 5. Elektrode (Ag/AgCl). 6. Klammer.

völlig ungeeignet gewesen. Am besten schien sich noch für das Arbeiten bei hohen Spannungsgefällen die Apparatur von CREMER UND TISELIUS zu eignen[26]. Hier wird der Filtrierpapierstreifen zwischen Glasplatten eingebettet und in ein Chlorbenzolbad versenkt. Das garantierte wohl eine ausgezeichnete Kühlung, gab aber bei niedermolekularen Stoffen häufig verwaschene Diagramme.

In der Folge wurde dann vom Verfasser eine Anordnung beschrieben, die den Anforderungen einigermassen gerecht wird und Spannungsgefälle bis etwa 50 V/cm gestattete[79]. Für Untersuchungen, die bei diesem oder höheren Spannungsgefällen

Literatur S. 119/121.

durchgeführt wurden, prägten WESTPHAL und Mit. den Namen "Hochvoltelektrophorese"[136]. Diese Bezeichnung, die physikalisch nicht genauer umrissen werden kann und soll, hat sich allgemein durchgesetzt und wird auch im Folgenden verwendet werden.

Seit dieser Zeit ist eine ganze Reihe von Apparaten entwickelt worden. Es gibt auch eine ganze Anzahl von Möglichkeiten der Kühlung[84], bevorzugt werden aber zur Zeit nur zwei Systeme: Apparaturen mit flüssigen und Apparaturen mit festen Wärmeaustauschern.

APPARATE

Apparate mit flüssigen Wärmeaustauschern[25,51,62,68,79,95,102,104,106,115,118,122,125]

Solche Apparate lassen sich oft mit primitiven, in jedem Labor vorhandenen Hilfsmitteln zusammenstellen. Trotz ihrer Einfachheit erreicht ihr Auflösungsvermögen bei vielen Stoffklassen das der weiter unten beschriebenen, um Grössenordnungen teueren Geräte mit festen Wärmeaustauschern. Nachteile sind die etwas umständlichere Handhabung und das Lösungsvermögen des flüssigen Wärmeaustauschers für manche Substanzen.

Diese Apparaturen bestehen im Wesentlichen (Fig. 1 und 2) aus einem senkrechten Zylinder (3), der mit einem organischen Lösungsmittel (2) gefüllt ist und oben und unten Elektrodengefässe mit den Stromzuführungen (4, 5) enthält. In dem hier gezeigten Apparat ist in einfachster Weise das obere Elektrodengefäss mittels einer Klammer (6) am Rande eines Standglases befestigt. Die Elektrodenräume füllt man mit einem Brei aus Puffer und Zellulosepulver. Ein Filtrierpapierstreifen wird mit der Pufferlösung befeuchtet und leicht zwischen Filtrierpapier abgepresst. Dann trägt man mittels eines Pinsels oder einer Kapillare die Substanz in Form eines Striches normal zur Längsrichtung des Streifens auf und hängt ihn zwischen die Elektrodengefässe. Hierauf setzt man die beiden Elektroden (5) ein—dieser Stand ist in Fig. 1 festgehalten—und füllt das Gefäss mit Toluol oder einer anderen organischen Flüssigkeit. Jetzt kann der Strom eingeschaltet und der Versuch begonnen werden.

Wird nun der Streifen durch den elektrischen Strom "geheizt", so gibt er die Wärme an die organische Phase ab und diese gerät in Konvektion; sie steigt auf und sinkt längs der kühlen Gefässwand zu Boden. Diese Art der Wärmeableitung ist recht wirksam, sie lässt sich durch die Verwendung einer kräftigen Aussenkühlung leicht weiter steigern. Es können auf diese Weise bis zu 0.2 W/cm^2 der Streifenfläche abgeführt werden. Auch waagrechte Anordnungen des Streifens wurden schon beschrieben[25,95,106,118], hier kann die Kühlwirkung mittels eines Rührers verbessert werden.

Die organische Phase soll einer Anzahl Anforderungen, wie Nichtmischbarkeit mit den verwendeten Puffern und untersuchten Substanzen, leichte Entfernbarkeit vom Filtrierpapier, Feuersicherheit, keine Belästigungen der Experimentierenden durch Dämpfe usw. genügen. Empfohlen wurden unter anderen Chlorbenzol[26], Hexan

bzw. Heptan[51], Tetrachlorkohlenstoff[77] und Toluol[79]. Tabelle I gibt eine Übersicht über die in diesem Zusammenhang interessierenden physikalischen und chemischen Eigenschaften[4, 26, 57].

Bei Apparaturen mit flüssigen Kühlmedien ist die Handhabung von übergrossen Gefässen oft umständlich. Deshalb ist die Länge des Filtrierpapierstreifens und damit

TABELLE I

Stoff	*Wärmeleitzahl in* $cal \cdot cm^{-1} \cdot grad^{-1} \cdot sec^{-1}$	*Löslichkeit in Wasser (g 100 ml)*	*Dampfdruck in Torr bei 20°*	*Temperatur der Selbstentzündung*	*Explosionsgrenzen in Mischung mit Luft*
Chlorbenzol	0.00030	0.049 (30°)	9	—	—
Heptan	0.00034	0.0052 (16°)	35	233°	1–6%
Tetrachlorkohlenstoff	0.00028	0.077 (25°)	91	—	—
Toluol	0.00036	0.063 (25°)	22	549°	1.3–7%

der Trennweg begrenzt. Es wurde aus diesem Grunde vorgeschlagen, den Streifen nicht gerade zwischen die Elektroden zu hängen, sondern ihn zu winkeln[122, 125], ihn zick-zack zu führen[95, 106] oder auf Rollen zu wickeln[8, 145].

Der Filtrierpapierstreifen soll, wie bereits erwähnt, zwischen Filtrierpapier abgepresst und verhältnismässig trocken (Gewicht des lufttrockenen Streifens: Puffer etwa wie 1:1.2) eingehängt werden. Damit in diesem Falle der überschüssige Puffer nur langsam aus den Elektrodengefässen angesaugt werden kann, sind diese mit einem Brei aus Filtrierpapier und Puffer[81, 122] auszufüllen. Ohne diese Vorsichtsmassnahme besteht die Gefahr, dass die aufgetragene Substanz weggeschwemmt wird ("Dochteffekt") und zerrinnt.

Für länger dauernde Versuche ist es ferner zweckmässig, reversibel arbeitende Elektroden zu verwenden, z.B. wie in Fig. 1 und 2 zwei Silber/Silberchlorid Elektroden, die durch ein Diaphragma von den Elektrodenräumen getrennt werden.

Apparate mit festen Wärmeaustauschern[10, 27, 32, 43, 82, 90, 133, 134, 140]

Die zweite Art von Apparaturen führt die Joulesche Wärme an gekühlte, elektrisch isolierte Platten ab. Man kann den Filtrierpapierstreifen zwischen zwei solche Flächen legen[43, 82], oft genügt auch nur eine und der Streifen wird mit einer Platte aus einem durchsichtigen Material bedeckt. Eine Apparatur dieser Art[87, 90], die seit 6 Jahren ohne wesentliche Änderung oder Reparatur im hiesigen Institut in Verwendung steht, zeigt die Fig. 3 und 4.

Sie besteht im wesentlichen aus einem Kühler (3), der mit einer Glasplatte (2) bedeckt ist. An den Enden befinden sich Puffergefässe (5), die durch Stromschlüssel (6) mit den reversibel arbeitenden Elektroden (8) verbunden sind. Alle diese Bestandteile werden von dem Kunststoffgehäuse (9) aufgenommen.

Zu Beginn des Versuches wird der halbfeuchte Filtrierpapierstreifen (1) auf die Glasplatte (2) gelegt und die Substanz aufgetragen. Die leitende Verbindung von Filtrierpapierstreifen (1) und Puffergefäss (5) erfolgt durch ein Stück eines mit einem Docht aus Filtrierpapier versehenen pufferfeuchten Zellophanschlauches (4). Nach

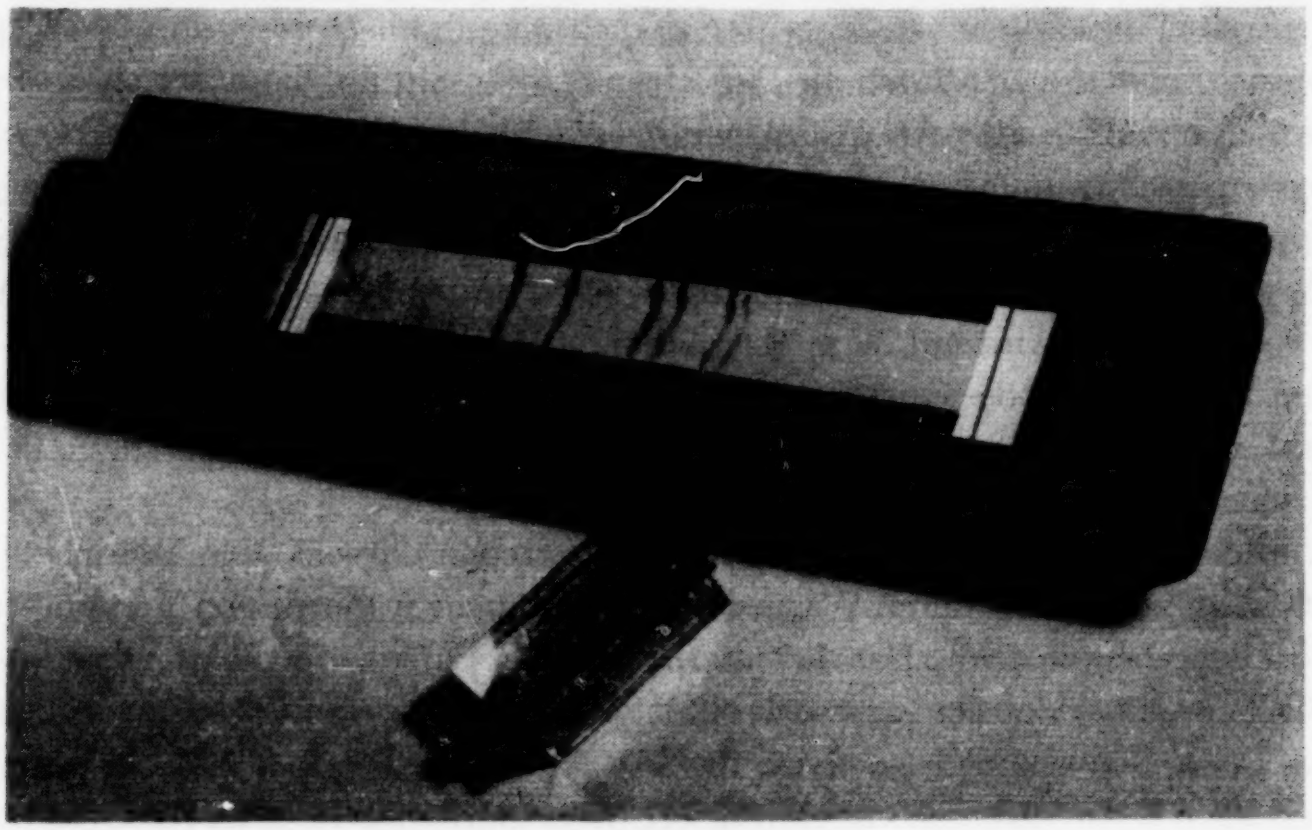


Fig. 3.

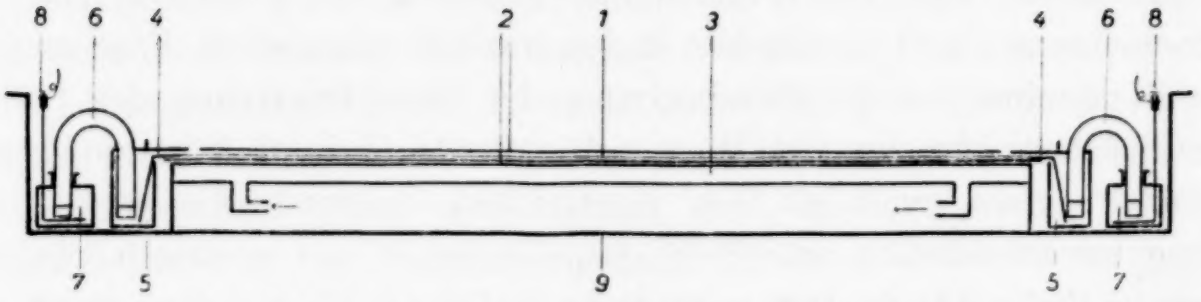


Fig. 4. 1. Filtrierpapierstreifen. 2. Glasplatten. 3. Kühler. 4. Zellophanmembran. 5. Puffergefäss. 6. Stromschlüssel. 7. Elektrodenkammer. 8. Elektrode ($Cu/CuCl_2$). 9. Gehäuse.

dem Bedecken des Streifens mit einer Glasplatte (2) werden die Elektrodengefässe (8) und die mit Puffer gefüllten Stromschlüssel (6) eingesetzt, das Gehäuse (9) mit einem (hier nicht gezeigten) Deckel geschlossen und die Verbindungen mit der Stromquelle hergestellt.

Einige Bedeutung kommt dem Feuchtigkeitsgehalt des Streifens zu[82,86,130]. Vom Standpunkt einer möglichst guten Wärmeableitung aus, wäre es natürlich günstiger, den Streifen so nass einzulegen, dass die Pufferlösung in direkten Kontakt mit der Kühlfläche kommt; das entspräche einem Verhältnis des Gewichtes vom lufttrockenen Streifen: Puffer von 1:2.0–2.5. Bei einem solchen Vorgehen würde aber das Auflösungsvermögen stark herabgestzt, da Puffer und Substanzlösung viel leichter verrinnen. Ausserdem herrschen in dem Pufferfilm zwischen dem Filtrierpapierstreifen und der Kühlfläche andere Wanderungsbedingungen, wie im Filtrierpapier selbst. Legt man aber, wie oben gefordert, einen verhältnismässig trockenen Streifen (Gewicht des lufttrockenen Streifens: Puffer gleich 1:1.0–1.2)[82] ein, so wird dieser durch die Zellulosefasern von der Kühlfläche in einem bestimmten Abstand von einigen hundertstel Millimetern gehalten werden. Wir haben also eine sehr enge "feuchte Kammer" vor uns, wie sie in geräumiger Ausführung die Niedervoltelektrophorese benützt. Um

Literatur S. 119/121.

einen Streifen mit einem gewünschten Feuchtigkeitsgehalt reproduzierbar herzustellen, zieht man ihn erst durch die Pufferlösung, quetscht ihn dann zwischen Filtrierpapier oder mit Hilfe einer Art Wäschewrangel[133, 134] ab und kontrolliert sein Gewicht. Ein so hergestellter halbtrockener Streifen hat das Bestreben, nach dem Einlegen in die Apparatur frischen Puffer aus den Puffergefässen anzusaugen, weshalb man ihn mittels der Zellophanmembrane von Flüssigkeitsströmungen isoliert. Bei der Apparatur von FOSTER[32] wird auf diese Massnahme verzichtet und man lässt die im elektrischen Feld wandernde Substanz gegen die Pufferströmung anlaufen; die in diesem Apparat gefundenen Beweglichkeiten ([37], s.a. Tabelle X) sind offenbar deshalb auch viel kleiner, als sie sonst gefunden wurden[82].

Von der durch den elektrischen Strom im Streifen entwickelten Wärme soll ein möglichst grosser Anteil durch Wärmeleitung und nicht in Form von Verdampfungswärme abgegeben werden. Das Lösungsmittel des Puffers destilliert sonst auf die Kühlflächen und bildet dort grosse Tropfen. Werden diese dann wieder vom Streifen angesaugt, so schwemmen sie die Substanz von diesen Stellen fort, wodurch der Streifen nach dem Anfärben ein charakteristisch marmoriertes Aussehen erhält (s.a. Tabelle V). Möglichst hydrophob gehaltene Kühlflächen (silikonisiertes oder mit Vaseline gefettetes Glas, PVC-Platten o.ä.) fördern das Auftreten von Übersättigungserscheinungen und vermindern dadurch die Kondensation. Eine weitere recht wirksame Massnahme ist die Herabsetzung der Dampfspannung des Puffers oder zumindest des Partialdruckes vom Wasser. Dies lässt sich durch Arbeiten bei niedrigen Temperaturen—etwa von 0 bis $+5^\circ$—erreichen, wodurch die Verwendung von Kühlaggregaten erforderlich wird[133, 134]. Beim Arbeiten mit niedrigen Temperaturen steigt aber die Viskosität des Puffers stark an (s. Tabelle II), um diese zu überwinden, muss man im gleichen Masse das Spannungsgefälle steigern. Wie die Tabelle II zeigt, hat man das Spannungsgefälle bei 0° fast zu verdoppeln, wenn man die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie bei 20° erreichen will. Dieser Effekt wird unter Umständen noch durch die Temperaturabhängigkeit des Dissoziationsgrades verschärft.

Eine wesentlich einfachere, aber nicht so universell anwendbare Methode, den Partialdruck des Wassers herabzusetzen, hat man durch Zusatz bestimmter Stoffe zum Puffer. Man erhält dann bei vielen bisher untersuchten Stoffklassen fast ebenso gute Auftrennungen, wie mit den kostspieligen Kühlaggregaten[87]. So vermag (Tabelle II) z.B. ein Zusatz von 10% Aceton den Partialdruck des Wassers nahezu zu halbieren. Beim Versuch dunstet dann das Aceton bevorzugt ab, kondensiert an der Kühlfläche und wird von dort wieder aufgesaugt. Da aber die mit dem oben genannten Gemisch koexistierende Dampfphase ca. 80% Aceton enthält und die meisten untersuchten Stoffe nicht löst, treten keine Störungen auf[87].

Bei Puffern, die verhältnismässig grosse Mengen an schwach dissoziierenden Verbindungen enthalten, z.B. dem Pyridin-Essigsäurepuffer[79], tritt dieser Effekt schon an sich auf. Glycerin und ähnliche Stoffe eignen sich im vorliegendem Fall kaum als Zusätze; sie erhöhen die Viskosität des Puffers viel zu stark, ohne den Partialdruck des Wassers entsprechend zu senken.

Literatur S. 119/121.

Das Spannungsgefälle und die Stromstärke sind nach oben durch die beschränkte Fähigkeit der Apparatur, die Stromwärme abzuführen, begrenzt. Von grosser Bedeutung für den Wärmeaustausch ist das Material, aus dem die Kühlerfläche besteht. An dieses werden recht widersprechende Anforderungen gestellt: es muss einerseits ein elektrischer Isolator sein und eine hohe Durchschlagsfestigkeit besitzen, anderseits soll es aber Wärme gut leiten. Nach der Widemann-Franzschen Regel gehen aber

TABELLE II[4,57,67]

	Temperatur in °C	*Partialdruck des Wassers in Torr*	*Viskosität in Zentipoise*	*Spannungsgefälle, die gleiche Wanderungsgeschwindigkeiten ergeben (berechnet nach dem Stokeschen Gesetz) V/cm*
Wasser	0	4.58	1.78	89
Wasser	10	9.20	1.30	65
Wasser	20	17.53	1.00	50
Wasser mit 10 (Gew.) % Aceton	20	8.0	1.18	59
Wasser mit 10 (Gew.) % Glycerin	20	17.0	1.31	65

beide Leitfähigkeiten parallel. Von den üblichen Werkstoffen zeigen Glas (Tabelle III) und keramische Massen das günstigste Verhalten. Beim Arbeiten mit nicht wässrigen Lösungsmitteln[94] sind sie auch viel resistenter gegen die organischen Flüssigkeiten als z.B. Kunststoffe. Wenn manche Apparaturen trotzdem völlig aus PVC oder Polymethacrylsäureestern gebaut sind, so liegt das an deren geringer Zerbrechlichkeit und leichter Bearbeitungsmöglichkeit.

Die erforderliche Dicke der Isolierschicht hängt von der Grösse der Apparatur und damit von der gesamten an diese gelegten Spannung ab. Kleinere Apparate

TABELLE III[4,103]

	Wärmeleitzahl in $cal \cdot cm^{-1} \cdot sec^{-1} \cdot grad^{-1}$	*Durchschlagsfestigkeit in kV/mm (nach VDE 0303)*
Luft	0.000062	etwa 1
Polyvinylchlorid (PVC)	0.00039	50
Polymethacrylsäureester	0.00043	40
Glas	etwa 0.002	20–40
Aluminium	0.585	—

gestatten zwar nur einen kurzen Trennweg, man kommt aber mit dünneren, also besser Wärme ableitenden Isolierschichten aus[82] und kann dementsprechend stärkere Spannungsgefälle verwenden. Auf diese Weise kann man noch Wärmemengen die einer Leistung von einigen zehntel Watt/cm² entsprechen, ableiten. Die meisten anderen Apparate—besonders solche mit Kunststoffplatten—sollten nicht stärker als mit 0.05–0.1 Watt/cm² belastet werden. Tabelle III gibt eine Übersicht über die Wärmeleitfähigkeit und Durchschlagsfestigkeit einiger in Hochvoltapparaturen verwendeter Materialien.

Literatur S. 119/121.

Der Wärmeaustausch in Apparaten mit festen Kühlflächen ist viel komplizierter als in Apparaturen mit flüssigen Wärmeaustauschern. Es muss erst die dünne Luftschicht zwischen dem Streifen und der Kühlfläche, dann die Isolierschicht und eventuell noch eine Metallschicht überwunden werden, ehe das kühlende Wasser oder die Sole die Wärme aufnimmt. Jede Unregelmässigkeit in der Wärmeableitung verursacht Verzerrungen der Substanzzonen, 1° Temperaturunterschied bewirkt einen Unterschied von etwa 3% in der Wanderungsgeschwindigkeit[26]. Der Filtrierpapierstreifen muss also sehr sorgfältig auf die Kühlfläche aufgelegt und fixiert werden. In den meisten Fällen genügt dazu eine plan geschliffene Glasplatte (Spiegelglas); bei manchen Apparaten ist eine eigene Spannvorrichtung vorgesehen[133,134].

Apparate für spezielle Zwecke

(*a*) *für grosse oder kleine Substanzmengen.* Die im Bisherigen geschilderten Methoden und Apparate gestatten Trennungen von Substanzmengen, die in der Grössenordnung von 10^{-6} bis 10^{-3} g liegen. Grössere Mengen kann man, wie in dem Kapitel über Proteine kurz geschildert werden wird, durch HVE in dünnen Platten z.B. aus Stärke[84,140] oder durch freie Zonenelektrophorese[85] trennen. Für die Untersuchung kleinerer Substanzmengen, etwa 10^{-9}–10^{-7} g sind eigene Apparate erforderlich (z.B. [31,93,127]). Als Träger für den Puffer werden dabei gequollene Fäden oder dünne Flüssigkeitsfilme verwendet. Da sich diese sehr leicht kühlen lassen, kann man sehr hohe Spannungsgefälle anlegen[87].

(*b*) *für Elektrophorese und Chromatographie.* Durch die Verknüpfung der Hochvoltelektrophorese mit chromatographischen Verfahren kann das Auflösungsvermögen stark gesteigert werden. Der allgemein anwendbare aber mühevolle Weg ist der, dass man die Substanzen nach jedem Arbeitsgang isoliert und dann neu aufträgt. Einfacher ist es, ein zweidimensionales Diagramm dadurch herzustellen, dass man in der einen Richtung die Elektrophorese, am besten mit einem flüchtigen Puffer, durchführt und nach dem Trocknen in der zweiten Richtung nach den Regeln der Papierchromatographie entwickelt[56,62]. Natürlich kann man, wie es DURRUM schon vor längerer Zeit gezeigt hat[29], auch in der zweiten Richtung bei einem anderen pH Wert elektrophoretisch trennen.

(*c*) *für isoelektrische Trennungen.* Gewöhnlich trennt man die Substanzen auf Grund ihrer verschiedenen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten im Papierstreifen. Sie lassen sich aber auch auf Grund ihrer verschiedenen isoelektrischen Bereiche oder allgemein durch eine pH Abhängigkeit ihrer Wanderungsgeschwindigkeit trennen (z.B. [110]). Dazu ist es notwendig, einen pH-Gradienten in der Richtung des elektrischen Feldes aufzubauen und zeitlich konstant zu halten. Ersteres gelingt relativ leicht z.B. durch Diffusion zweier Puffer mit verschiedenem pH, durch Elektrolyse an einem Halbleiter usw.; die zeitliche Konstanz erreicht man nur sehr schwer und das ist wohl auch der Grund, warum trotz einer Anzahl hier nicht näher besprochener Versuche nicht das Auflösungsvermögen einer normalen Hochvoltelektrophorese erreicht werden konnte, zumindest nicht bei niedermolekularen Stoffen.

Literatur S. 119/121.

PUFFER UND LÖSUNGSMITTEL FÜR DIE HOCHVOLTELEKTROPHORESE (HVE)

Die Wahl des richtigen Lösungsmittels bzw. Puffers ist für eine gute Auftrennung ebenso wichtig, wie die Apparatur selbst. Es genügt nicht immer, den pH Wert des Puffers zwischen die pK-Werte der zu untersuchenden Substanzen zu legen[23] bzw. bei einer Komplexbildung die analogen Funktionen zu berücksichtigen, man müsste auch u.a. Adsorptions- und Verdrängungserscheinungen in Rechnung stellen. Am leichtesten gelingt das noch bei den Adsorptionserscheinungen. Das Untersuchungsmaterial wird mit dem zur Elektrophorese bestimmten Puffer papierchromatographiert. Schweifbildung und R_F-Werte kleiner als 1 lassen bei der Elektrophorese ebenfalls eine Schweifbildung in der Richtung zum Auftragungsort und langsame Wanderung erwarten. Das ist vor allem bei basischen organischen Stoffen, etwa Alkaloiden und Farbstoffen, sehr ausgeprägt. Auch das scheinbar paradoxe Verhalten von Arginin bei der Papierionophorese—es wandert trotz eines höheren isoelektrischen Punktes oft langsamer als Lysin—kommt so zustande. Manchmal erhält man zwar Trennungen gerade durch solche Adsorptionserscheinungen, meist sind sie aber sehr unerwünscht. Eine Therapie im Falle von echter Adsorption an die Zellulosefaser ist schwierig; sie gelingt oft nur bei der Verwendung wasserarmer oder nicht-wässriger Lösungsmittel oder durch die Benützung von Kunststoffpapier, z.B. dem aus PVC-Fasern bestehendem "Rhovylpapier" 1001 der Fa. Schleicher und Schüll[87,116]. Im letzteren Fall muss man allerdings wegen der ungleichmässigen Textur des Papieres gewisse Verzerrungen der Bande in Kauf nehmen. Ist die Adsorption durch Ionenaustausch (freie Carboxylgruppen in der Zellulose) bedingt, so genügt oft die Verwendung von Erdalkaliionen-hältigen Puffern[80,81,87]; im übrigen treten oft, besonders bei anorganischen Ionen, Verdrängungserscheinungen ein, die eine Auftrennung eher fördern.

Niedermolekulare Stoffe, die nicht adsorbiert werden, zeigen meist eine Schwanzbildung in der Wanderungsrichtung. Diese wird vor allem bei einer zu starken Beladung des Papiers mit Untersuchungsmaterial deutlich. An den Stellen grösserer Konzentration wandert nämlich die Substanz langsamer, als an den Stellen kleinerer und zwar deshalb, weil dort die Feldstärke durch die grössere Leitfähigkeit herabgesetzt wird. Kleinere Konzentrationen sind an der Front und an der Rückseite der Zone und hier wandert auch die Substanz schneller. An der Front wandert sie in den Puffer hinein, verteilt sich auf eine grössere Fläche und macht damit die Grenze zwischen der Substanzzone und dem Puffer unscharf. Auf der Rückseite wird sie wieder in die Zone hereingezogen, diese bleibt daher scharf. Die analogen Erscheinungen sind von der freien Elektrophorese her wohl bekannt und mathematisch behandelt[119,129,131].

Bequemer als salzhältige Puffer sind vielfach Lösungsmittel mit flüchtigen Bestandteilen, da sie durch einfaches Trocknen oder Absublimieren aus dem Streifen entfernt werden können. Bisher bewährten sich vor allem Lösungen mit Ameisensäure–Essigsäuregemischen (um pH 2)[62]; Pyridin–Essigsäure (pH 3.5–6)[51,79,102]; Ammoniak–Ameisensäure bzw. Essigsäure (pH 6–10)[54,88]; Trimethylamin–Ameisensäure–Essigsäure und Kohlensäure (pH 3–6 und 7–12)[96]; Collidin–Essigsäure (um

pH 7)[92]; Ammoncarbonat (um pH 8)[24]; weniger Erfahrung liegt noch mit Collidin–Salzsäure (pH 6.5–8.3)[99], Mono- bzw. Triäthanolamin–Salzsäure (pH 6.5–11)[120] und ähnlichen Gemischen vor.

Wie bereits erwähnt, ist es in manchen Fällen günstiger, von Wasser als Hauptbestandteil des Lösungsmittels abzugehen und andere Flüssigkeiten zu verwenden. In solchen Systemen tritt oft eine Verringerung störender Adsorptionserscheinungen ein und es können auch wasserunlösliche Stoffe untersucht werden. Nachteilig macht sich oft die geringe Leitfähigkeit dieser Lösungsmittel und auch der Umstand, dass Filtrierpapier nicht in ihnen quillt, bemerkbar. Ferner können für diese Versuche nur Apparate, die Kühlflächen aus Glas besitzen, Verwendung finden.

DURRUM UND PAUL zeigten z.B., dass eine Anzahl organischer Farbstoffe, die in wässrigen Puffern stark adsorbiert werden, in hochprozentigem Alkohol noch befriedigend wandern[30]. Kristallviolett, ein Farbstoff, der von gequollener Zellulose stark zurückgehalten wird und deshalb bei einem normalen Papierelektrophoreseversuch nicht wandert, bewegt sich sehr deutlich in verschiedenen organischen Lösungsmitteln (Tabelle IV).

TABELLE IV[94]

Lösungsmittel	*Dielektrizitätskonstante*	*Viskosität in Zentipoise 20°*	*Wanderungsweg in cm bei 90 V cm und 20 min Versuchsdauer*
Äthylenglykol	41.2	19.9	0.7
Nitromethan	39.4	0.66	3.8
Dimethylformamid	36.7	3.76	6.0
Nitrobenzol	35.7	2.01	3.2
Äthanol	28.8	1.19	4.2
Isopropanol	26.0	2.39	5.0
n-Butanol	19.2	2.95	2.5
Pyridin	13.6	0.95	4.0
Äthylendichlorid	10.5	0.83	0.7

Bei der Wahl des Lösungsmittels sollte man erwarten, dass nach der Coehnschen Regel und dem Stokeschen Gesetz solche mit hoher Dielektrizitätskonstante und niedriger Viskosität am besten geeignet sein müssten. Aber auch hier gibt es, wie man in der Tabelle am Beispiel des Dimethylformamides sehen kann, Ausnahmen.

Da die Dissoziation in den organischen Lösungsmitteln meist geringer als im Wasser ist, muss das Untersuchungsmaterial genügend leicht in einen ionisierten Zustand übergehen. Bei an sich nicht ionisierbaren Stoffen gelingt dies durch Einbau entsprechender funktioneller Gruppen. HASHIMOTO[49] führte zum Beispiel Triterpene durch Behandeln mit Schwefeltrioxyd in Sulfosäuren über, die er dann in Butanol–Essigsäure weitgehend auftrennen konnte.

In jüngerer Zeit wurden auch geschmolzene anorganische Salze als Elektrolyten verwendet, als Träger diente Asbestpapier[21]. In einem solchen System gelang, wie von den Autoren an einer anderen Stelle dieser Zeitschrift ausführlich berichtet wird, die Trennung von Isotopen.

Literatur S. 119/121.

TABELLE V

EINIGE BEI DER HOCHVOLTELEKTROPHORESE AUFTRETENDE FEHLER UND DEREN BEHEBUNG[87]

Symptom	*Ursache*	*Behebung*
Substanzzonen sind deutlich begrenzt, aber verzerrt	Ungleichmässige Erwärmung, Ionenstärke, pH oder Feuchtigkeit; ungleichmässige Textur des Papiers; ungleichmässiges Trocknen	Streifen muss überall gleichmässigen Kontakt mit Kühlfläche haben, gleichmässig feucht sein usw. Gleichgewicht nach dem Einlegen abwarten, ev. Entsalzen.
Substanzzone bildet Halbmond	Kühlung am Streifenrand ist stärker als in der Streifenmitte	Seitlich Streifen auflegen[88,133,134].
Substanzzone erscheint marmoriert und verwaschen	Kühlung reicht nicht aus, Kühlfläche zu nass	Wärmeentwicklung vermindern, Kühlfläche hydrophob und trocken halten, eventuell senkrechten Wärmegradienten anlegen[132].
Abnormale Wanderungsgeschwindigkeiten	Dochteffekt[81]. Strom setzt aus. Elektroosmose (bes. bei hohen pH Werten und in Glaspapier), Puffer gefroren	Zellophanbarrieren überprüfen, Stromstärke kontrollieren, nicht wandernde Substanz zur Erkennung des Ausgangspunktes zugeben.
Papier trocknet und verglimmt an scharf begrenzten Streifen oder wird bei flüss. Wärmeaustauschern durchsichtig	Papier ist schlecht abgedeckt (bes. in der Nähe der Puffergefässe), in Puffergefässen und Streifen sind nicht die gleichen Puffer, pH-Verschiebungen, Kühlmittel ist nicht mit Puffer gesättigt	Ergibt sich aus Ursache.
Schweifbildung *in* der Wanderungsrichtung	Zu hohe Konzentration an Untersuchungsmaterial, seltener: pH Effekt[22]	Ergibt sich aus Ursache, Ionenstärke des Puffers erhöhen.
Schweifbildung *entgegengesetzt* der Wanderungsrichtung	Adsorption, seltener: pH Effekt[22]	Bei möglichst niedrigen pH Werten arbeiten, organische Lösungsmittel zum Puffer geben, Puffer mit organischen Basen oder Erdalkaliionen verwenden, Glasfaser- oder Kunststoffpapier benützen[11,87,116].
Untersuchungsmaterial bildet Streifen bis zum Start zurück	Material war nicht ganz gelöst, Papier wurde angeritzt[140]	Ergibt sich aus Ursache.
Schrumpfung der Substanzzone	Substanz wurde mit einem anderen Lösungsmittel aufgetragen (z.B. aus Alkohol)[140]	Ergibt sich aus Ursache.

UNTERSUCHTE SUBSTANZKLASSEN

Aminosäuren

Aminosäuregemische sind schon oft mittels der Hochvoltelektrophorese (HVE) untersucht worden[1,2,45,50,51,62,79,89,102,115,133,134,140,141]. Mit ihr konnte sogar eine

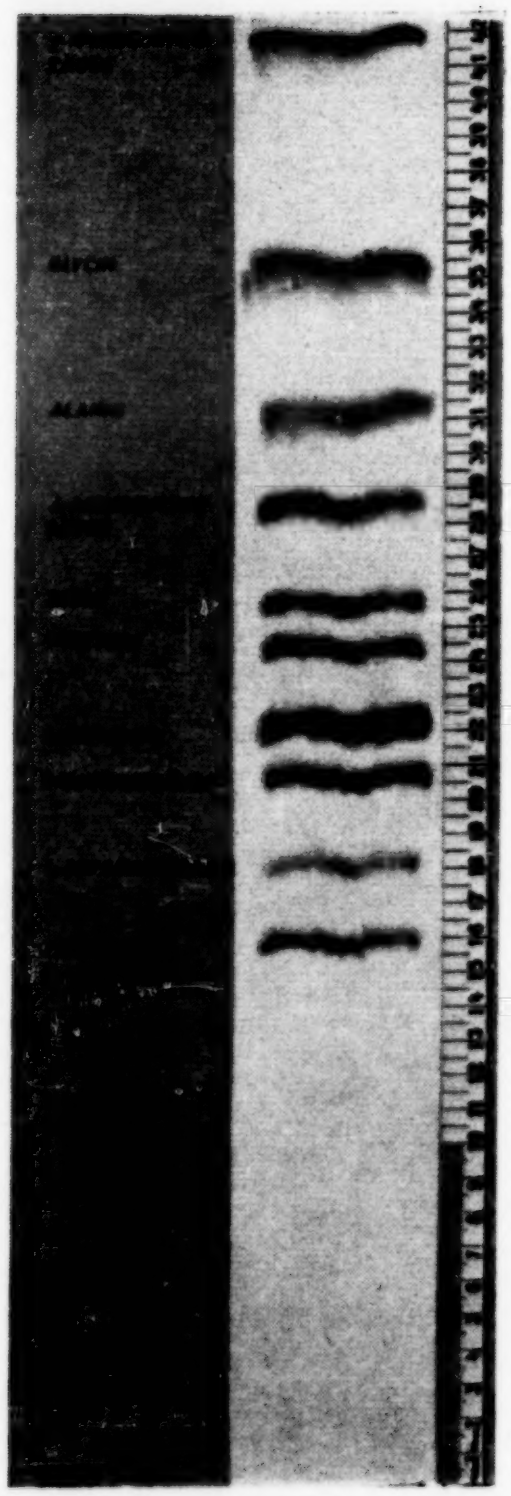


Fig. 5.

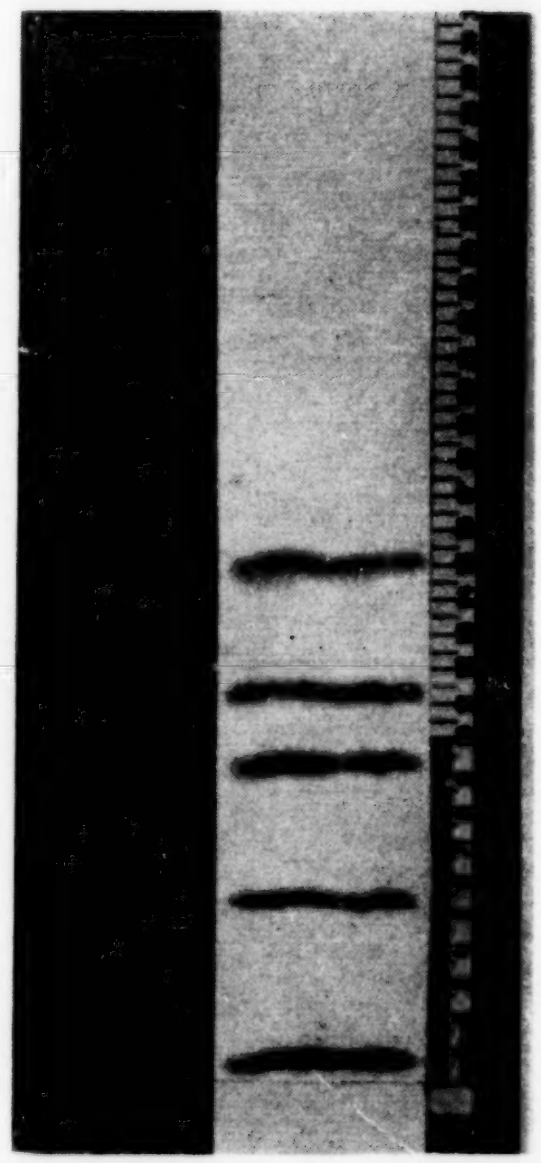


Fig. 6.

Fig. 5. Apparat nach Fig. 3; 40 V/cm, 2 mA/cm Streifenbreite; 120 min; 10°. Lösungsmittel: 3 ml 80% Ameisensäure, 12 ml Eisessig, 15 ml Aceton auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt (pH 1.9). Anfärbung: 0.2% Ninhydrin in Butanol.

Fig. 6. Apparat nach Fig. 3; 33.5 V/cm, 3.7 mA/cm Streifenbreite; 90 min; 10°. Lösungsmittel: 2 ml Pyridin, 4 ml Eisessig, 15 ml Aceton auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt (pH 4.4). Anfärbung: 0.2% Ninhydrin in Butanol.

neue Aminosäure(δ-Oxyleucenin) im Hydrolysat des Knollenblätterpilzgiftes nachgewiesen werden[142].

Die Zerlegung eines Gemisches der natürlichen Aminosäuren, etwa eines Proteinhydrolysates, gelingt am besten bei pH Werten um 2[45,62,89,115,133,134]. Wie Fig. 5 zeigt, entspricht dabei die Auftrennung etwa der eines guten eindimensionalen Papierchromatogrammes. Einige Zahlen für die Wanderungsgeschwindigkeit gibt Tabelle VI.

Will man eine bestimmte Gruppe von Aminosäuren genauer untersuchen, so bietet die HVE der Papierchromatographie gegenüber Vorteile. Es lassen sich z.B. viele nicht α-Aminosäuren in Pyridin–Essigsäurepuffern von pH Werten um 4.5

leicht neben den anderen Aminosäuren erkennen und auftrennen; sie wandern dann zwischen den Monoaminomonokarbonsäuren und den Hexonbasen[89] (Fig. 6). Auch die saueren Aminosäuren (z.B. Cystinsäure, Asparaginsäure und Glutaminsäure) werden innerhalb von wenigen Minuten bei diesem pH getrennt[79,89]. Eine Trennung der basischen Aminosäuren, besonders von Arginin und Lysin wird durch Adsorptions-

TABELLE VI

QUOTIENT DER WANDERUNGSWEGE VON AMINOSÄURE/ALANIN[141] ZU KATHODE

Ameisensäure–Essigsäuregemisch[62] von pH 1.9

Aminosäure	*Quotient*
Lysin	1.4
Histidin	1.29
Arginin	1.27
Glycin	1.15
Alanin	1.00
Serin	0.84
Valin	0.82
Leucin	0.77
Isoleucin	0.77
Methionin	0.72
Glutaminsäure	0.69
Asparaginsäure	0.64
Tyrosin	0.55

erscheinungen stark behindert. Sie ist auf Zellulosepapier oft nur bei höheren pH-Werten (z.B. in 0.1 *N* Sodalösung) möglich[87]. Der Nachweis erfolgt dann zweckmässigerweise mit 1,4-Naphthochinonsulfonsaurem Natrium (Folins-Reagenz) an Stelle des sonst üblichen Ninhydrins.

Peptide

Die erste systematische Untersuchung von niedrigen Peptiden mittels HVE führten KICKHÖFEN UND WESTPHAL[63] durch. Bei Verwendung einer einfachen Apparatur mit

TABELLE VII

TRENNUNG VON PEPTIDEN

Wanderung zur Kathode in cm, 70 V/cm, 1.1 mA/cm Streifenbr. Ameisensäure–Essigsäuregemisch von pH 1.9, 60 min.

Peptide	*Wanderung cm*
Alanylglycin	22.8
Glutathion	5.6
Glutaminylglycin	18.3
Glycin	16.4
Glycylglycin	23.9
Glycylglycylglycin	21.4
Glycylleucin	19.7
Glycylleucylalanin	18.3
Glycylvalylalanin	18.8
Glycyltyrosin	16.5
Leucylglycin	19.4
Leucylglycylglycin	17.9
Leucyltyrosin	15.6

Literatur S. 119/121.

flüssigem Wärmeaustauscher konnten sie eine Anzahl Di- und Tripeptide auftrennen. (s.a. Tabelle VII)

Ähnliche Trennungen von synthetisch hergestellten Gemischen niedriger Peptide[45,133,134] wurden seither wiederholt beschrieben und ebneten damit den Weg zur Trennung von partiellen Proteinhydrolysaten. Hier erwies sich die HVE oft als Methode der Wahl[1,108]. So verwendeten sie SANGER und Mit. bei der Festlegung der Schwefelbrücken des Insulins[102] und bei der Untersuchung von Schweine- und Schafinsulin[18,50]. REDFIELD UND ANFINSEN benützten sie zur Zerlegung der beim enzymatischen Abbau von Ribonuklease erhaltenen Peptidgemische[100,101]. Diese Autoren beschrieben auch die Trennung von DNP-Peptiden mittels HVE. Um die bei diesen Verbindungen auftretenden Adsorptionserscheinungen zu bekämpfen und um die Löslichkeit zu erhöhen, empfehlen sie dem Puffer reichlich Harnstoff zuzusetzen. Bei den gewöhnlichen Peptiden ist jedoch von so einem Zusatz abzuraten, da die desorbierende Wirkung hier gering ist und die Ninhydrinreaktion gestört wird. TURBA UND ESSER[123] verfolgten den zeitlichen Einbau von ^{14}C in Aminosäuren, Peptide und Proteine bei Zugabe von markiertem Acetat zu Torulahefe und trennten die dabei anfallenden, sehr komplexen Gemische mittels HVE und Papierchromatographie.

Auch zur Untersuchung höherer Peptide, wie sie in verschiedenen Proteohormonen vorliegen, konnte die HVE verwendet werden. So wurde mit ihrer Hilfe Choriongonadotropin aus Urin[91], Oxytozin und Vasopressin aus Hypophysenextrakten[87,121], sowie ein oxytozisch wirkendes Peptid aus partiell hydrolysiertem Serumeiweiss[124] isoliert.

Schon KICKHÖFEN UND WESTPHAL zeigten, dass sich die im Urin vorkommenden Peptide gut mittels HVE untersuchen lassen[63]. HEILMEYER und Mit. bauten diese Methode aus und führten ausserordentlich umfangreiche Untersuchungen der im menschlichen Serum (Rest-Stickstoff) und anderen Körperflüssigkeiten vorhandenen Aminosäuren, Peptide und biogenen Amine durch[51,52]. Es ist hier nicht möglich auf diese Arbeiten und ihre klinischen Aspekte einzugehen, sie sollen einer Monographie dieser Autoren vorbehalten bleiben.

Proteine

Für die Trennung von Proteinen ist die HVE in der beschriebenen Form wenig geeignet. Nur in günstigen Fällen wurden Ergebnisse erhalten, die mit denen der normalen Niedervoltelektrophorese konkurrieren können[81,109,118]. Ansonsten tritt besonders in halbfeuchten Streifen meist ein Verschmieren und Verzerren der Bande ein. Gute Trennungen in Zellulosepapier sind nur dann zu erwarten, wenn dieses sehr nass (Trockengewicht:Puffer wie 1:2.0–2.5) zur Anwendung gelangt und gasförmige Wärmeaustauscher verwendet werden. Es ist allerdings in diesem Fall nicht leicht, eine ausreichende Kühlung zu erreichen. Von den bisher untersuchten Möglichkeiten (z.B. Abgabe der Wärme an gut leitende Gase wie Wasserstoff oder Helium[78], Abgabe durch Strahlung[84], Einhängen in eine stehende Nebelkammer[55,84]) ist es noch immer am einfachsten, eine Kühlung durch Verdunsten des Puffers, bzw. dessen

Lösungsmittel zu erreichen. Die dabei auftretenden Dochteffekte[97,98] lassen sich durch eine entsprechende Form des Filtrierpapieres (Trapez- oder Kreisform[13,84]) zu einer Verbesserung der Trennwirkung ausnützen. Die dabei erreichbaren Spannungsgefälle liegen um 20 V/cm.

Man kann auch auf die Verwendung von Zellulosepapier überhaupt verzichten und andere Stoffe oder Versuchsanordnungen zur Stabilisierung des Puffers heranziehen. Solche sind z.B. Kunststoffpapier[116], Stärke oder ähnliche hydrophile Pulver[84,139], Gele aus Stärke oder ähnlichem Material[113] und geeignet geformte Elektrophoresekammern[85]. In allen diesen Fällen ist ein Arbeiten mit Spannungsgefällen von 20–50 V/cm möglich, soferne man für eine wirksame Kühlung sorgt (Apparat mit festem Wärmeaustauscher) und die Versuchsanordnung möglichst flach baut[87]. Erfahrungen liegen vor allem für das Arbeiten in dünnen Stärkeschichten vor, es konnten in ihnen Gemische empfindlicher Enzyme weitgehend zerlegt und untersucht werden (z.B.[83,141]). Als sehr erfolgreich erwies sich die von SMITHIES eingeführte Elektrophorese in konzentrierten Stärkegelen[113]. In diesen Gelen tritt neben der elektrophoretischen Auftrennung durch eine Art Ultrafiltration auch eine Fraktionierung nach der Teilchengrösse ein. Unter diesen Versuchsbedingungen konnten menschliche[113,114,111] und tierische Sera[5] weiter als mit irgend einer anderen elektrophoretischen Methode zerlegt werden.

Biogene Amine

In Elektropherogrammen von biologischem Material findet man häufig zwischen den basischen Aminosäuren und der Kathode einige nur zart mit Ninhydrin angefärbte Bande. Es handelt sich hier meist um biogene Amine.

Ihr Vorkommen im Harn untersuchte eingehend WEBER[130] und später HONEGGER[56]. Es wurden unter anderem Ammoniak, Methylamin, Dimethylamin, Äthylamin, Colamin, Pyrrolidin und Piperidin durch Papierionophorese in Citratpuffer von pH 3.8 und durch nachfolgende Papierchromatographie[56] getrennt. Eine Anzahl der von HEILMEYER und Mit.[51,52] im enteiweissten Serum (Rest-Stickstoff) nachgewiesenen Amine konnte von GAYER[42] identifiziert werden. Diese Amine wurden aus dem sehr komplexen Gemisch mit Natriumtetraphenyloborat (Kalignost, Tetragnost) gefällt, der Niederschlag mit Salzsäure zersetzt und durch Ausschütteln mit Äther vom

TABELLE VIII[42]

QUOTIENT DER WANDERUNGSWEGE DES AMINS/ARGININ

Pyridin–Essigsäure–Wasser–80% Ameisensäure wie 1:10:89:13.5; pH 2.3; Kühlung mit Heptan; etwa 60 V/cm.

Amin	*Quotient*	*Ninhydrinfarbe*
5-Hydroxytryptamin	0.65	blaugrau
Adrenalin	0.75	—
Tryptamin	0.87	blauviolett
Tyramin	0.97	blassviolett
Arginin	1.00	blauviolett
Histamin	1.66	violett

Literatur S. 119/121.

überschüssigen Reagenz getrennt; nach dem Einengen wurden sie mittels HVE untersucht. Die Tabelle VIII gibt über die Beweglichkeit einiger dieser Stoffe Auskunft. Dieses Verfahren eignete sich auch gut zum Nachweis biogener Amine in tierischen Giften[87].

Recht gut lassen sich auch mit der HVE eine Anzahl von Guanidinderivaten

TABELLE IX

TRENNUNG VON GUANIDINDERIVATEN[73]

Wanderung zur Kathode in cm; 15 V/cm; 0.4 mA/cm Streifenbr.; Veronalpuffer pH 8.6; $\mu = 0.1$; 120 min; 10°. Anfärbung mit α-Naphthol–Diacetyl-Reagenz.

Guanidinderivat	*Wanderung cm*
Citrullin	3.2*
Glycocyamin	3.85
Creatin	4.00
γ-Guanidinobuttersäure	4.00
Arginin	8.05
Arcain	10.70
Dimethylguanidin	12.85
Agmatin	13.00
Methylguanidin	13.90
Guanidin	14.90

*Mit Ehrlichs Reagenz nachgewiesen.

trennen, die man dann spezifisch am Papier nachweisen kann. Einen Anhaltspunkt für die zu erwartende Wanderungsgeschwindigkeit gibt die Tabelle IX[73].

Kohlenhydrate und mehrwertige Alkohole

Die Fähigkeit von Kohlenhydraten und mehrwertigen Alkoholen mit Borsäure Komplexe zu bilden, ist seit langem bekannt (vergl. die zusammenfassenden Darstellungen von BÖESEKEN[15] und ZITTLE[146]). Erst seit Ende 1952 aber begann man diese Eigenschaft zur Trennung von Kohlenhydratgemischen mittels elektrophoretischer Methoden auszunützen[25,32,48,59,82]. So konnte vom Verfasser gezeigt werden[82], dass man mittels HVE in einer 0.08 molaren Boraxlösung eine Anzahl Zucker, mehrwertige Alkohole und Phenole trennen und Zusammenhänge zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Struktur erkennen kann. Diese Versuche wurden in der Folge bestätigt und erweitert. So untersuchten WERNER UND WESTPHAL[133,134,135] Kohlenhydrate, die in Pyrogenen vorkommen; GROSS[43,44] beschäftigte sich u.a. mit Disacchariden und einem neuen Trisaccharid, der Kestose. Er trennte ferner ein Gemisch von Glykol, Glycerin, Erythrit, Sorbit, Mannit und Dulcit in einer 0.05 *M* Boraxlösung[46].

Quantitative Angaben über die Beweglichkeiten von Kohlenhydraten und mehrwertigen Alkoholen wurden mehrfach gemacht[25,48,82,117]. Die Verschiedenheit der Versuchsmethodik—vor allem in Hinblick auf den Puffergehalt des Filtrierpapieres und der Berücksichtigung des Dochteffektes—macht einen direkten Vergleich dieser Angaben nicht durchführbar. Das bei weitem umfangreichste Material stammt von FOSTER[32-39] und die Tabelle X ist nach seinen Angaben zusammengestellt.

Literatur S. 119/121.

TABELLE X

QUOTIENT DER WANDERUNGSWEGE SUBSTANZ/GLUCOSE

Apparatur nach FOSTER[32]; 15–22 V/cm[34,9]; Boratpuffer etwa pH 10 (7.44 g Borsäure in 1 l *N*/10 Natronlauge—vom Autor manchmal irrtümlich als 0.2 *M* bezeichnet)[37].

Kohlenhydrat	*Quotient*	*Literatuur*
Amylopectin	0.25*	37
Amylose	0.18**	37
1,4-Anhydro-D-dulcit	0.47	35
1,5-Anhydro-2-desoxysorbit	0.20	39
1,6-Anhydro-β-D-glucopyranose	0.00	39
2,5-Anhydro-D-mannit	0.04	9
1,5-Anhydro-D-xylit	0.00	39
L-Arabinose	0.96	17
D-Arabit	0.90	17
Äthyl-2-desoxy-α-D-glucopyranosid	0.17	39
Äthyl-2,3-didesoxy-α-D-glucopyranosid	0.10	39
Äthyl-α-D-glucofuranosid	0.70	39
Äthyl-β-D-glucofuranosid	0.65	39
Äthyl-α-D-glucopyranosid	0.17	39
Cellobiose	0.28	34
1-Desoxy-D-arabinose	0.41	36
1-Desoxy-D-glucose	0.20	36
2-Desoxy-D-ribose	0.33	17
1,3-Dihydroxyaceton	0.78	17
2,3-Dimethyl-D-glucose	0.12	34
2,4-Dimethyl-D-glucose	0.05	34
3,4-Dimethyl-D-glucose	0.31	34
2,3-Dimethyl-L-rhamnose	0.023	32
2,4-Dimethyl-L-rhamnose	0.046	32
3,4-Dimethyl-L-rhamnose	0.36	32
Dulcit (Galactitol)	0.98	17
meso-Erythrit	0.75	17
D-Fructose	0.90	17
L-Fucose	0.89	17
D-Galactose	0.93	17
L-Galaheptulose	0.89	17
Gentiobiose	0.75	34
	0.72	17
D-Glucose	1.00***	9,17,32–35,37,39
D-Glucose-1-phosphat	1.10	17
D-Glucuronsäure	1.20	17
DL-Glycerinaldehyd	0.79	17
Glycerin	0.44	17
D-Glycero-D-galaheptit	1.00	17
D-Glycero-D-mannoheptit	0.92	6
Glycogen	0.31§	37
Lactose	0.38	34
Laminaribiose (3-(β-Glucosido)-glucose)	0.69	34
D-Lyxose	0.67	91
Maltose	0.36§§	37
iso-Maltose	0.69	34
D-Mannit	0.90	17
D-Mannoheptulose	0.87	17
D-Mannose	0.72	17
Melezitose	0.22	17

(Fortsetzung S. 110)

* Scheinb. Ionenbeweglichkeit (Def. bei [130]) 0.51–69·10^{-6} cm^2 V^{-1} sec^{-1} (Ref. [37]).
** Scheinb. Ionenbeweglichkeit 0.35–57·10^{-6} cm^2 V^{-1} sec^{-1} (Ref. [37]).
*** Scheinb. Ionenbeweglichkeit 2.26–2.74·10^{-6} cm^2 V^{-1} sec^{-1} (Ref. [37]).
§ Scheinb. Ionenbeweglichkeit 0.61–0.90·10^{-6} cm^2 V^{-1} sec^{-1} (Ref. [37]).
§§ Scheinb. Ionenbeweglichkeit 0.81–1.08·10^{-6} cm^2 V^{-1} sec^{-1} (Ref. [37]).

Literatur S. 119/121.

TABELLE X (Fortsetzung)

Kohlenhydrat	*Quotient*	*Literatur*
Melibiose	0.80	34
Methyl-*α*-D-arabofuranosid	0.035	9
Methyl-*α*-L-arabofuranosid	0.035	9
Methyl-*β*-D-arabofuranosid	0.035	9
Methyl-*α*-D-arabopyranosid	0.40	36
Methyl-*β*-D-arabopyranosid	0.40	36
Methyl-*α*-D-fructofuranosid	0.60	35
Methyl-*β*-D-fructofuranosid	0.04	35
Methyl-*α*-D-fructopyranosid	0.71	35
Methyl-*β*-D-fructopyranosid	0.59	35
Methyl-*α*-D-galactofuranosid	0.41	35
Methyl-*β*-D-galactofuranosid	0.31	35
4-Methyl-D-galactose	0.27	34
Methyl-*α*-D-glucofuranosid	0.73	35, 39
Methyl-*α*-D-glucopyranosid	0.09	34
	0.11	39
Methyl-*β*-D-glucopyranosid	0.19	39
2-Methyl-D-glucose	0.23	34
3-Methyl-D-glucose	0.82	34
4-Methyl-D-glucose	0.24	34
6-Methyl-D-glucose	0.82	34
Methyl-*β*-D-gulopyranosid	0.72	35, 37
Methyl-*α*-D-lyxopyranosid	0.45	36
Methyl-*β*-D-lyxopyranosid	0.26	36
Methyl-*α*-D-mannopyranosid	0.42	35
Methyl-*β*-D-mannopyranosid	0.31	36
Methyl-(4-O-methyl)-*β*-D-glucopyranosid	0.00	39
Methyl-*α*-D-xylofuranosid	0.30	39
Methyl-*β*-D-xylofuranosid	0.30	39
Methyl-*α*-D-xylopyranosid	0.00	39
Methyl-*β*-D-xylopyranosid	0.00	39
myo-Inosit	0.53	17
Nigerose	0.69	17
1,2-O-Isopropyliden-*α*-D-glucofuranose	0.73	9, 35, 39
Raffinose	0.28	17
L-Rhamnose	0.52	17
D-Ribose	0.77	17
Saccharose	0.18	17
	0.17	39
α-Schardinger Dextrin	0.14	37
β-Schardinger Dextrin	0.12	37
Sophorose (2-(*β*-Glucosido)-D-glucose)	0.33	17
Sorbit (Glucitol)	0.89	17
α,*α*-Trehalose	0.19	17
α,*β*-Trehalose	0.23	39
β,*β*-Trehalose	0.20	39
2,3,4-Trimethyl-D-glucose	0.00	34
2,3,6-Trimethyl-D-glucose	0.00	34
3,5,6-Trimethyl-D-glucose	0.71	34
D-Xylose	1.00	17

Es wurden auch Betrachtungen über Zusammenhänge zwischen der Anordnung der Hydroxylgruppen und der Wanderungsgeschwindigkeit der Boratkomplexe angestellt[6, 34, 82]. Am wirksamsten sind, wie man auch schon aus Leitfähigkeitsmessungen wusste[15, 146], *cis*-ständige OH-Gruppen am C_1 und C_2 des Zuckers. Blockiert man die glykosidische Hydroxylgruppe etwa mit einer Methylgruppe, so zeigt dieses

Literatur S. 119/121.

Glykosid meist eine viel geringere Beweglichkeit, als der freie Zucker. Daneben sind aber auch, wie die merkliche Beweglichkeit des Methylgalaktosides zeigt, benachbarte alkoholische OH-Gruppen des Ringes wirksam. In einigen Fällen (Methylxylosid) muss man sogar eine Komplexbildung an nicht *cis*-ständigen Hydroxylgruppen oder wie bei dem Glukose-2-methyläther ("2-Methylglucose") eine Beteiligung von Aldehydstrukturen in Erwägung ziehen[31].

Eine andere Möglichkeit, Kohlenhydrate zur Wanderung im elektrischen Feld zu bringen, besteht in einer geeigneten Substitution der Carbonylgruppe, was z.B. durch Verwendung von einer 0.4 *M* Natriumbisulfitlösung als Puffer[41] oder durch die Umwandlung in die N-Benzylglycosylammonium Verbindung[6] eintritt. Besonders im ersten Fall besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit und der Teilchengrösse[41].

Eine Wanderung tritt auch bei einigen mehrwertigen Alkoholen in Bleiacetat oder Natriumarsenit enthaltenden Puffern auf[40].

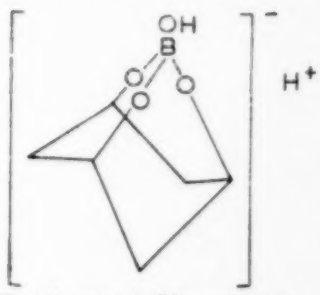
Cyclite

Zahlreiche mehrwertige cyclische Alkohole wandern in Boratpuffern mit unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten[3, 33, 38]. Für das Zustandekommen der Komplexbildung mit Borsäure und damit der Wanderung im elektrischen Feld können zwei strukturelle Eigenschaften von Bedeutung sein[3]:

(1) *Cis*-ständige Hydroxylgruppen ("Böesekenkomplexe"[15]), das ist der häufigste und der nach den bisherigen Anschauungen zu erwartende Fall.

(2) "Tridentat-Komplexe" (s. nebenstehende Formel).

Die Bildung einer solchen Verbindung erfolgt in Sechserringen mit 1,3,5 ständigen Hydroxylgruppen in achsialer Stellung. Sie erklärt (s. Tabelle XI) unter anderem die Beweglichkeit des *cis*-Phloroglucites, des *scyllo*-Quercites und den nur geringen Verlust an Beweglichkeit bei in 2 und 4 O-methyliertem *myo*-Inosit.



Tridentat-Komplex des *cis*-Phloroglucites

Purine, Nucleoside und Nucleotide

Diese Stoffklasse wurde häufig mit papierelektrophoretischen Methoden untersucht, wobei aber meist nur verhältnismässig niedrige Spannungsgefälle zur Anwendung kamen[19, 20, 60, 77, 112, 128, 132], weitere Angaben in den Monographien[14, 72, 78, 122, 143, 144].

Bei hohen Spannungsgefällen trennten zuerst TURBA und Mit.[125] die drei Adenosinphosphorsäuren und einige Nucleoside in einem Pyridin–Essigsäurepuffer von pH 6.45. CRESTFIELD UND ALLEN untersuchten verschiedene Nucleotide in Phosphat und Boratpuffern; durch die verschiedenen Möglichkeiten der Komplexbildung mit Borsäure versuchten sie 3′ und 5′ phosphorylierte Verbindungen zu trennen[28].

Mittels HVE, spektralanalytischen Methoden und Farbreaktionen bestimmten MICHL UND HABERLER den Gehalt verschiedener Drogen an Purinen und methylierten Xanthinen[88]. Adenin und Guanin liessen sich dabei leicht bei pH 3.6 trennen und mit einem Bromphenolblau-Reagenz[88] anfärben. Die Xanthinderivate trennte man bei pH 10.6 (s. Tabelle XII).

Literatur S. 119/121.

TABELLE XI[3]

QUOTIENT DER BEWEGLICHKEITEN DES CYCLITES/GLUCOSE

Apparatur nach FOSTER[32]; etwa 20 V/cm; 0.012 *M* Boraxlösung.

Cyclit	*Stellung der OH-Gruppen*	*Quotient*
Inosite:		
scyllo-Inosit	(1:3:5/2:4:6)	0.02
(+) Inosit	(1:2:4/3:5:6)	0.28
neo-Inosit	(1:2:3/4:5:6)	0.30
myo-Inosit	(1:2:3:5/4:6)	0.30
muco-Inosit	(1:2:4:5/3:6)	0.87
allo-Inosit	(1:2:3:4/5:6)	0.54
epi-Inosit	(1:2:3:4:5/6)	1.50
cis-Inosit	(alle *cis*)	1.60
Quercite:		
scyllo-Quercit	(1:3:5/4:6)	0.05
proto-Quercit	(1:3:4/2:5)	0.05
vibo-Quercit	(1:2:4/3:5)	0.07
epi-Quercit	(1:2:3:5/4)	1.17
cis-Quercit	(alle *cis*)	1.60
Methyläther des Inosites:		
1-Methyl-*myo*-inosit(Bornesit)		0.02
2-Methyl-*myo*-inosit		0.29
4-Methyl-*myo*-inosit(Ononit)		0.45
5-Methyl-*myo*-inosit(Sequoyit)		0.05
2-Methyl(—)-inosit(Quebrachit)		0.14
3-Methyl(+)-inosit(Pinit)		0.23
1:3-Dimethyl-*myo*-inosit(Dambonit)		0.00
Cyclohexantriole:		
1:3/2 Cyclohexantriol		0.00
1:2/3 Cyclohexantriol		0.08
cis-1:2:3-Cyclohexantriol		0.05
cis-1:3:5-Cyclohexantriol(Phloroglucit)		0.11
Cyclohexandiole:		
trans-1:2-Cyclohexandiol		0.00
cis-1:2-Cyclohexandiol		0.01
trans-1:3-Cyclohexandiol		0.00
cis-1:3-Cyclohexandiol		0.00

TABELLE XII[88]

QUOTIENT DER WANDERUNGSWEGE DER SUBSTANZ/XANTHIN

In 1 *N* NH_3:1 *N* Essigsäure etwa 20:1; pH 10.6; 40 V/cm.

Substanz	*Quotient*
Coffein	0.00
Theobromin	0.44
Hypoxanthin	0.83
Xanthin	1.00
Theophyllin	1.14

Literatur S. 119/121.

TABELLE XIII[128]

QUOTIENT DER WANDERUNGSWEGE DES NUCLEOTIDES/ORTHOPHOSPHAT

1 l Puffer enthält 92 ml Buttersäure (etwa 1 *N*) und 1 g NaOH (0.025 *N*), pH etwa 6.4; 10 V/cm.

Nucleotid	*Quotient*
Adenosin-2′-phosphat	0.23
Adenosin-3′-phosphat	0.23
Adenosin-5′-phosphat	0.21
Adenosin-5′-diphosphat	0.58
Adenosin-5′-triphosphat	0.86
Cytidin-2′-phosphat	0.13
Cytidin-3′-phosphat	0.13
Dihydrodiphosphopyridinnucleotid	0.48
Diphosphopyridinnucleotid	0.13
Flavin-Adenin-Dinucleotid	0.36
Flavinmononucleotid	0.36
Guanosin-2′-phosphat	0.42
Guanosin-3′-phosphat	0.42
Orthophosphat Ionen	1.00
Uridin-2′-phosphat	0.55
Uridin-3′-phosphat	0.55
Uridin-5′-phosphat	0.55

TABELLE XIV[10]

SCHEINBARE IONENBEWEGLICHKEIT VON ORGANISCHEN SÄUREN

In $cm^2\ V^{-1}\ sec^{-1}$ (Def. bei [130]) in verdünnter Ameisensäure pH 2.0; Apparatur nach Ref.[10].

Säure	$K \cdot 10^4$	*Scheinbare Ionenbeweglichkeit*
Pikrinsäure	3810	6.1
Oxalsäure	650	9.0
Dichloressigsäure	330	6.5
Maleinsäure	120	6.7
Brenztraubensäure	30	3.7
Monochloressigsäure	15	2.9
Aconitsäure	15	2.4
Fumarsäure	10	2.2
Weinsäure	9.8	2.3
Citronensäure	8.3	1.9
Sulfanilsäure	6.2	1.6
Äpfelsäure	3.8	1.4
Glycerinsäure	2.3	1.2
Glykolsäure	1.5	0.7
Itaconsäure	1.5	0.7
Milchsäure	1.4	0.7
Bernsteinsäure	0.64	0.2
Glutarsäure	0.47	0.1
Adipinsäure	0.33	0.1
Valeriansäure	0.16	0.05

Literatur S. 119/121.

In der Literatur und in den oben angegebenen Referaten finden sich weitere quantitative Angaben über die Wanderungsgeschwindigkeiten verschiedener hierher gehörender Verbindungen, die bei der HVE eine schnelle Orientierung gestatten. Nur bei Verbindungen, die leichter von Filtrierpapier adsorbiert werden, etwa Guanidinderivaten, ist manchmal die Wanderungsgeschwindigkeit herabgesetzt. Auch die in der Tabelle XIII angegebenen Werte von WADE UND MORGAN[128] liessen sich unter den Bedingungen der HVE reproduzieren.

Organische Säuren

Wasserlösliche organische Säuren lassen sich, soferne nur ihre Dissoziationskonstanten

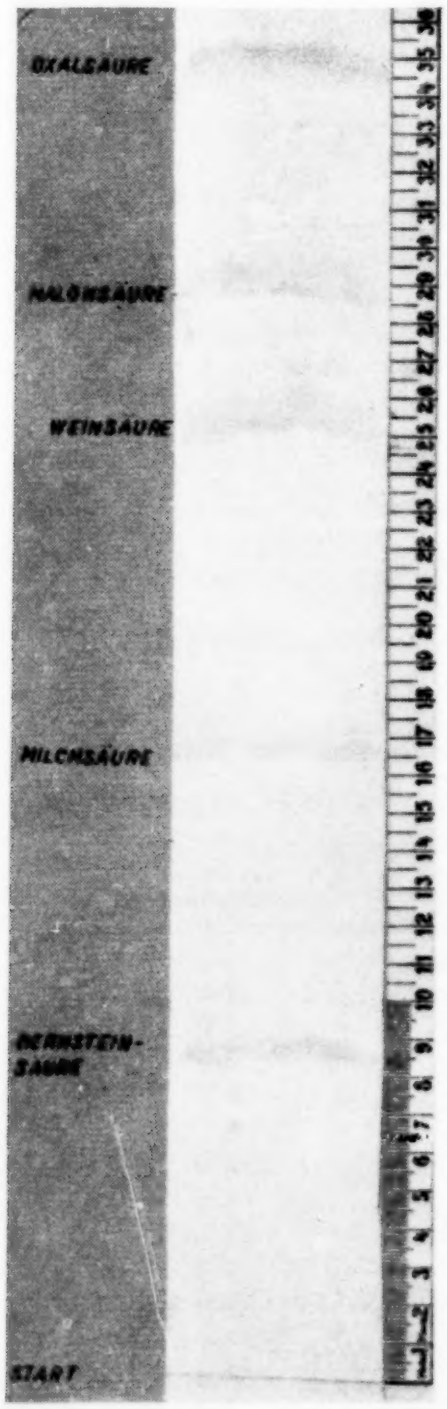


Fig. 7.

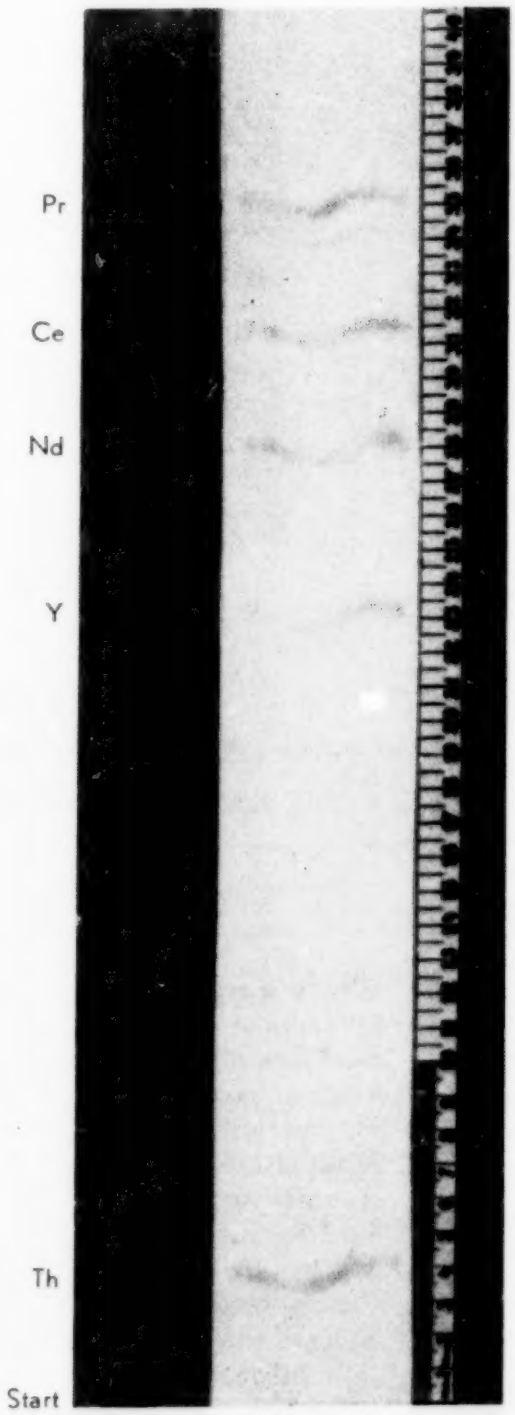


Fig. 8.

Fig. 7. Apparat nach Fig. 3; 40.3 V/cm, 2.3 mA/cm Streifenbreite; 90 min; 10°. Lösungsmittel: 1.5 ml Pyridin, 5.5 ml Eisessig, 15 ml Aceton auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt (pH 4.1). Anfärbung: 10 mg Glucose, 5 mg Arabinose in 3 ml Äthanol lösen und mit 0.5 ml Anilin und 3 ml Butanol versetzen; nach Besprühen auf 140° erhitzen[87].

Fig. 8. Apparat nach Fig. 3: 46 V/cm, 1.1 mA/cm Streifenbreite; 90 min; 10°. Lösungsmittel: 15 ml Aceton auf 100 ml mit 0.1 *N* Milchsäure aufgefüllt. Anfärbung: 0.2% Brenzkatechinviolett in 2 *N* Ammoniak, nach Besprühen Überschuss mit dest. Wasser auswaschen[87].

Literatur S. 119/121.

genügend verschieden sind, gut elektrophoretisch trennen[79,138]. Besonders Gemische von schwer oder nicht flüchtigen Oxy- und Dicarbonsäuren sind leicht zu untersuchen. Für stärkere Säuren wurden als Lösungsmittel verdünnte Ameisensäure (etwa 0.55 *N*; pH 2.0[10]), für schwächere Pyridin–Essigsäure (pH 4.1)[87] verwendet. Der Nachweis kann dann nach dem Abdunsten des Puffers leicht mittels Indikatoren oder anderen in der Papierchromatographie üblichen Methoden erfolgen. Haltbare Anfärbungen (s. Fig. 7) bekamen wir mit einer Art umgekehrten Zuckernachweis[87]. Tabelle XIV und Fig. 7 zeigen einige Beispiele.

Weitere Untersuchungen vor allem mit den in biologischen Materialien häufig vorkommenden Säuren stellte GROSS[47] an. Eine Trennung höherer Fettsäuren in 2 *N* NH_3, wie sie BARNETT UND SMITH beschrieben haben[7], ist mittels HVE wegen zu starker Adsorptionserscheinungen in Filtrierpapier nicht gelungen. Die Auftrennung

TABELLE XV[75]

ALKALOIDE, WANDERUNG ZUR KATHODE IN cm

LKB-Apparat, 8 V/cm, Whatman No. 1 Papier, Versuchsdauer 180 min. Universalpuffer nach BRITTON UND ROBINSON, 1:4 verdünnt[99]. Nachweis: UV-Licht, Dragendorffs Reagenz, K-Jodoplatinat.

Verbindungen	*pH 6.4*	*pH 10.5*
Arecolin	13.6	2.8
Aspidospermin	8.7	0
Atropin (DL-Hyoscyamin)	10.7	8.0
Berberin	2.0	1.05
Bicucullin	6.2	0
Boldin	3.0	0
Brucin	6.9	2.1
Bulbocapnin	3.3	0.6
Calebassin	8.0	7.8
Chelidonin	5.8	0
Chinin	7.6	2.5
Cinchonin	8.0	3.0
Cinchonidin	9.3	3.2
Cocain	11.0	5.3
Colchicin	2.1	1.7
Coniin	13.0	10.0
Corlumin	5.9	0
Corydin	7.1	1.4
Curarin	11.0	—
N-Dichlormethyl-dimethylberberin	10.4	7.8
Dimethyltubocurarin	9.9	8.7
Emetin	8.5	—
Ephedrin	10.0	10.6
Ergometrin	3.8	1.3
Eserin	10.5	—
Fluorocurin	8.0	8.0
Galegin	11.8	10.8
Glaucin	3.8	0.3
Harmin	2.6	0
Heroin	9.5	2.85
Homatropin(Mandelsäuretropylester)	10.4	10.0
L-Hyoscyamin	10.3	6.9
Hydrastin	6.1	0
Hydrastinin	13.2	11.3

(Fortsetzung S. 116)

TABELLE XV (Fortsetzung)

Verbindungen	*pH 6.4*	*pH 10.5*
Jervin	5.3	0
Kotarnin	12.5	10.8
Lupanin	10.6	8.7
Lupinin	12.1	10.5
Mezcalin	10.2	8.2
Morphin	10.0	2.85
Narcein	2.6	1.65
Narcotin	5.4	0
Nicotin	12.3	4.5
Papaverin	3.0	0
Pilocarpin	10.6	1.95
Piperin	0.4	0
Protopin	7.7	3.9
Protoveratrin	6.5	—
Sanguinarin	1.1	0.0
Scopolamin	10.4	3.3
Sempervirin	0.5	0.0
Spartein	10.8	9.9
Strychnin	8.5	0.0
Tetrahydropalmatin	4.1	0.0
Tropacocain(Benzoesäurepseudotropylester)	10.2	8.8
Tropin	14.5	0.0
Tubocurarin	8.4	4.7
Veratrin	6.2	1.4
Yohimbin	6.8	1.0

von Huminsäuregemischen, die sonst recht schwierig ist, gelang SCHEFFER *et al.* mittels HVE und Kühlung mit Chlorbenzol[106].

Alkaloide

Auch Alkaloide, soferne sie genügend wasserlöslich sind, lassen sich gut papierelektrophoretisch untersuchen. Es liegen auch zahlreiche Untersuchungen (s. in den Monographien[14,72,78,143,144]) vor, die aber meist bei niedrigen Spannungsgefällen durchgeführt worden sind. Von diesen Arbeiten soll nur eine von MARINI-BETTOLO[75,76] angeführt werden, weil dort eine grössere Anzahl von Alkaloiden unter den gleichen Versuchsbedingungen und bei verschiedenen pH-Werten untersucht wurden. Einen Ausschnitt davon gibt die Tabelle XV.

Mittels Hochvoltelektrophorese wurde von KUHN UND MICHL eine systematische Untersuchung der Tabakalkaloide durchgeführt, die dabei gefundenen Wanderungsgeschwindigkeiten zeigt die Tabelle XVI.

Aus diesen Zahlen lassen sich gewisse Zusammenhänge zwischen der elektrischen Wanderungsgeschwindigkeit und der chemischen Konstitution erkennen. So wandern Verbindungen, bei denen ein N-Atom sekundär gebunden ist (Nor-Verbindungen) schneller, als die entsprechende Verbindung mit einem dreifach substituiertem N-Atom: Nornikotin ist schneller als Nikotin, Anabasin geschwinder als N-Methylanabasin und so fort. Ferner wandern auch die mit einer aliphatischen Seitenkette versehenen Verbindungen Metanikotin und N-Methylmetanikotin schneller als die entsprechenden cyclischen Derivate. Tabakalkaloide mit Doppelbindungen im zweiten

Literatur S. 119/121.

TABELLE XVI[90]

SCHEINBARE IONENBEWEGLICHKEIT

Alkaloid	*Scheinbare Ionenbeweglichkeit (Def.[130]) in $cm^2 . V^{-1} . sec^{-1}$ bei 10°*	
	pH 5.0 K-Biphthalat Puffer[4]	*pH 9.2 0.025 M Boraxlösung*
Metanikotin	12.7	7.7
Methyl-metanikotin	12.5	7.0
Nornikotin	12.2	7.0
Anabasin	10.7	6.1
Nikotin	12.1	2.5
Anatabin	10.5	2.3
N-Methylanabasin	10.1	0.8
N-Methylanatabin	10.0	0.8
Myosmin	8.0	0.8
Oxynikotin	3.9	0.7
Nikoton	3.4	0.7
Nikotyrin	3.2	0
Nornikotyrin	1.5	— 0.7

Ring—der erste ist ja hier auf alle Fälle ein Pyridinring—zeigen eine geringere Beweglichkeit, als solche mit gesättigten Systemen, so ist etwa Anatabin (Piperiden-Ring) langsamer als Anabasin (Piperidin-Ring).

Das abweichende Verhalten von Nikotyrin und Nornikotyrin ist durch Adsorptionserscheinungen bedingt. Unterwirft man sie nämlich mit dem zur HVE verwendeten Puffern einer Papierchromatographie, so findet man R_F Werte von 0.66 (Nikotyrin) bzw. 0.37 (Nornikotyrin) gegen etwa 0.9 der anderen Stoffe; es scheint daher verständlich, dass ihre Wanderungsgeschwindigkeit entsprechend kleiner sein wird. Diese Erscheinung ist übrigens auch bei anderen Alkaloiden relativ häufig anzutreffen. So wanderte bei einer Untersuchung von Suchtmitteln[101] Cocain zwischen Codein und Morphin, während man auf Grund der Dissoziationskonstanten eine schnellere Wanderung erwarten sollte.

Anorganische Ionen

Über die Untersuchung anorganischer Stoffe mittels HVE liegen nur vereinzelte Mitteilungen vor. Der Verfasser[79] trennte seinerzeit Cu^{+2} von Cd^{+2}, wobei das Cu^{+2}-Ion wider Erwarten langsamer als das Cd^{+2}-Ion wanderte. WERNER UND WESTPHAL erhielten verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten für Fe^{+2}, Co^{+2}, Cd^{+2}, Pb^{+2}, Cu^{+2} und Fe^{+3} in einem Ameisensäure–Essigsäuregemisch[134]. SCHIER konnte ein Gemenge von Li^+-, Na^+- und K^+-Ionen zerlegen und die einzelnen Ionen quantitativ bestimmen[107]. WIELAND UND PFLEIDERER untersuchten eine Anzahl von Derivaten der Phosphorsäure[141].

Die meisten der zahlreichen, bei niederen Spannungsgefällen durchgeführten Untersuchungen (vergl. Monographien, besonders die von LEDERER[72]) lassen sich auch mit der HVE machen, wobei die Trennwirkung oft beträchtlich gesteigert werden kann. Ein Gemisch einiger seltener Erden konnte z.B. mühelos nach den in der Literatur[70,71,105] beschriebenen Verfahren aufgetrennt werden (Fig. 8).

Literatur S. 119/121.

Es wurde auch versucht, Isotope mit diesem Verfahren zu trennen[58]. BONNIN *et al.*[16] gelang auf diese Weise eine teilweise Entmischung von ^{22}Na und ^{24}Na.

AUSBLICK

Wie schon mehrfach betont worden ist, beschränkt sich der Anwendungsbereich der HVE keineswegs nur auf die hier besprochenen Substanzklassen; ihre Einführung dürfte bei den meisten der bisher papierelektrophoretisch untersuchten niedermolekularen Stoffen eine Verbesserung und Beschleunigung der Auftrennung mit sich bringen.

Recht angenehm ist es dabei, dass man bei Stoffen deren Dissoziationskonstanten bekannt sind, die Wanderungsgeschwindigkeit im Vorhinein abschätzen kann. Umgekehrt ist es aber auch ohne weiteres möglich, unbekannte Dissoziationskonstanten durch Vergleich mit bekannten Stoffen ungefähr zu bestimmen, wozu man nur sehr wenig Substanz benötigt. Man kann auch die Dissoziationskonstante eines zunächst nicht identifizierten Stoffes schätzen und dann dazu passende Substanzen—die Substanzklasse ist ja aus der angewendeten Farbreaktion bekannt—in Tabellenwerken suchen. Es konnten zum Beispiel nach dieser Methode im hiesigen Institut wiederholt organische Säuren, wie sie beim Abbau von Naturstoffen mit Kaliumpermanganat entstehen, erkannt werden[87].

Im übrigen gestattet schon die Wanderungsrichtung bei unbekannten organischen Stoffen Rückschlüsse auf das Vorhandensein oder Fehlen von Carboxyl- oder Aminogruppen. Benachbarte Hydroxylgruppen lassen sich durch ihre Reaktion mit Borat erkennen[59] und Carbonylgruppen in manchen Fällen durch die Wanderung in bisulfithältigen Puffern.

Die HVE wurde auch schon oft bei organisch synthetischen Arbeiten eingesetzt. So treten beispielsweise bei der Synthese von Tosylargininmethylester aus Arginin vier Reaktionsprodukte auf und zwar Arginin, Argininmethylester, Tosylarginin und Tosylargininmethylester; KICKHÖFEN[64] trennte diese vier Substanzen innerhalb von 50 min bei pH 7.3 und 60 V/cm. In einem anderen Fall methylierte er Histidin mit Methyljodid in flüssigem Ammoniak; die drei im Reaktionsgemisch vorhandenen Produkte 1-Methylhistidin, 3-Methylhistidin und Ausgangsmaterial konnten in 2½ Stunden getrennt werden[64]. Bei der Kolbeschen Synthese mit β-Naphthol entsteht u.a. ein Gemisch von β-Naphthol-1-carbonsäure und β-Naphthol-3-carbonsäure, das, wie WIELAND UND PFLEIDERER zeigten[141], innerhalb von 3 Stunden zerlegt werden konnte. Die gleichen Autoren analysierten mittels HVE auch die bei der Nitrierung von Phenolen anfallenden Produkte[141] und mehrere andere bei Synthesen von organischen Verbindungen anfallende Stoffgemische.

Bisher wurden bei solchen Versuchen hauptsächlich wässrige Pufferlösungen verwendet. Durch die Anwendung wasserarmer oder nichtwässeriger Lösungsmittel lassen sich aber viele bisher noch nicht erfasste Stoffgruppen untersuchen, doch das muss weiterer Arbeit vorbehalten bleiben.

Literatur S. 119/121.

LITERATUR

[1] C. B. ANFINSEN UND R. R. REDFIELD, *Advances in Protein Chem.*, 11 (1956) 1.
[2] C. B. ANFINSEN, M. SELA UND H. TRITCH, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 156.
[3] S. J. ANGYAL UND D. J. MCHUGH, *J. Chem. Soc.*, (1957) 1423.
[4] J. D'ANS UND E. LAX, *Taschenbuch für Chemiker und Physiker*, J. Springer, Berlin, 1943.
[5] G. C. ASHTON, *Nature*, 179 (1957) 824.
[6] S. A. BARKER, E. J. BOURNE, P. M. GRANT UND M. STACEY, *Nature*, 177 (1956) 1125; 178 (1956) 1221.
[7] A. J. G. BARNETT UND D. K. SMITH, *Nature*, 174 (1954) 659.
[8] J. BARROLLIER, *Naturwissenschaften*, 42 (1955) 486.
[9] B. C. BERA, A. B. FOSTER UND M. STACEY, *J. Chem. Soc.*, (1956) 4531.
[10] H. BERBALK, *Monatsh. Chem.*, 85(1954)1314;
H. BERBALK UND O. SCHIER, *Monatsh. Chem.*, 86 (1955) 146.
[11] E. W. BERMES, Jr. UND H. J. MCDONALD, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 416.
[12] G. BERRAZ, *Anales asoc. quim. arg.*, 31 (1942) 96.
[13] S. BERLINGOZZI, G. RAPI UND A. MAZZA, *Chim. e ind. (Milano)*, 37 (1955) 351; 38 (1956) 87.
[14] R. J. BLOCK, E. L. DURRUM UND G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press, Inc., New York, 1955.
[15] J. BÖESEKEN, *Advances in Carbohydrate Chem.*, 4 (1949) 189.
[16] A. BONNIN, M. CHEMLA UND P. SÜE, *Compt. rend.*, 241 (1955) 40.
[17] E. J. BOURNE, A. B. FOSTER UND P. M. GRANT, *J. Chem. Soc.*, (1956) 4311.
[18] H. BROWN, F. SANGER UND R. KITAI, *Biochem. J.*, 60 (1955) 556.
[19] D. C. BURKE, *Chem. & Ind. (London)*, (1954) 1510.
[20] D. C. BURKE UND A. B. FOSTER, *Chem. & Ind. (London)*, (1955) 94.
[21] M. CHEMLA UND A. BONNIN, *Compt. rend.*, 241 (1955) 1288.
[22] *Ciba Foundation Symposium on Paper Electrophoresis*, hrg. v. G. E. W. WOLSTENHOLME UND E. C. P. MILLAR, London, 1956.
[23] R. CONSDEN, A. H. GORDON UND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 40 (1946) 33.
[24] R. CONSDEN, A. H. GORDON, A. J. P. MARTIN UND R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 41 (1947) 596.
[25] R. CONSDEN UND W. M. STANIER, *Nature*, 169 (1952) 783.
[26] H. D. CREMER UND A. TISELIUS, *Biochem. Z.*, 320 (1950) 273.
[27] A. M. CRESTFIELD UND F. W. ALLEN, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 422.
[28] A. M. CRESTFIELD UND F. W. ALLEN, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 424.
[29] E. L. DURRUM, *J. Colloid. Sci.*, 6 (1951) 274.
[30] E. L. DURRUM UND M. H. PAUL, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4721.
[31] J. E. EDSTRÖM, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 378.
[32] A. B. FOSTER, *Chem. & Ind. (London)*, (1952) 828, 1050.
[33] A. B. FOSTER, *Chem. & Ind. (London)*, (1953) 591.
[34] A. B. FOSTER, *J. Chem. Soc.*, (1953) 982.
[35] A. B. FOSTER, *J. Chem. Soc.*, (1957) 1395.
[36] A. B. FOSTER, E. F. MARTLEW UND M. STACEY, *Chem. & Ind. (London)*, (1953) 825.
[37] A. B. FOSTER, P. A. NEWTON-HEARN UND M. STACEY, *J. Chem. Soc.*, (1956) 30.
[38] A. B. FOSTER UND M. STACEY, *Chem. & Ind. (London)*, (1953) 279.
[39] A. B. FOSTER UND M STACEY, *J. Chem. Soc.*, (1955) 1778.
[40] J. L. FRAHN UND J. A. MILLS, *Chem. & Ind. (London)*, (1956) 578.
[41] J. L. FRAHN UND J. A. MILLS, *Chem. & Ind. (London)*, (1956) 1137.
[42] J. GAYER, *Biochem. Z.*, 328 (1956) 39.
[43] D. GROSS, *Nature*, 172 (1953) 908.
[44] D. GROSS, *Nature*, 173 (1954) 487.
[45] D. GROSS, *Nature*, 176 (1955) 72.
[46] D. GROSS, *Nature*, 176 (1955) 362; *Chem. & Ind. (London)*, (1956) 931.
[47] D. GROSS, *Nature*, 178 (1956) 29.
[48] Y. HASHIMOTO, I. MORI UND M. KIMURA, *Nature*, 170 (1952) 975.
[49] Y. HASHIMOTO, *Experientia*, 9 (1953) 194.
[50] J. I. HARRIS, F. SANGER UND M. A. NAUGHTON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 156.
[51] L. HEILMEYER, R. CLOTTEN, I. SANO, A. STURM, JR. UND A. LIPP, *Klin. Wochschr.*, 32 (1954) 831.
[52] L. HEILMEYER, *Vorträge aus dem Gebiet der klinischen Chemie und Cardiologie*, Stuttgart, 1956, S. 56.
[53] D. HENSCHLER, *Z. physiol. Chem.*, 305 (1956) 34.
[54] C. W. H. HIRS, S. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 669.
[55] C. V. HOLT, K. D. VOIGT UND K. GAEDE, *Biochem. Z.*, 323 (1952) 345.
[56] C. G. HONEGGER, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 1671; 40 (1957) 846.
[57] National Research Council, *International Critical Tables of Numerical Data*, Bd. 3, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, 1928.

[58] J. V. IRIBARNE, *Chemia (Buenos Aires)*, 16 (1955) 41.
[59] L. JAENICKE, *Naturwissenschaften*, 39 (1952) 86.
[60] A. S. JONES, D. S. LETHAM UND M. STACEY, *J. Chem. Soc.*, (1956) 2579.
[61] R. KELLER UND J. GICKLHORN, in E. ABDERHALDEN, *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Abt. V/2, 1928, S. 1206.
[62] B. KICKHÖFEN UND O. WESTPHAL, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 655.
[63] B. KICKHÖFEN UND O. WESTPHAL, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 659.
[64] B. KICKHÖFEN, *Ciba Foundation Symposium on Paper Electrophoresis*, 1956, S. 206.
[65] D. VON KLOBUSITZKY UND P. KÖNIG, *Arch. exptl. Pathol. Pharmakol., Naunyn-Schmiedeberg's*, 192 (1939) 271.
[66] P. KÖNIG, *Actas III. Congr. sudam. quim.*, 2 (1937) 334.
[67] LANDOLT-BÖRNSTEIN, *Physikalisch-chemische Tabellen*, 5. Aufl., Erg. Werk II/2, Springer, Berlin, 1931.
[68] G. LANGE, *Biochem. Z.*, 326 (1955) 172.
[69] M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 6 (1952) 521.
[70] M. LEDERER, *Compt. rend.*, 236 (1953) 200.
[71] M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 11 (1954) 145.
[72] M. LEDERER, *An Introduction to Paper Electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam, London, New York, Princeton, 1957.
[73] S. LISSITZKY, I. GARCIA UND J. ROCHE, *Experientia*, 10 (1954) 379.
[74] W. MACH UND R. GEFFERT, *Arzneimittel-Forsch.*, 3 (1953) 534.
[75] G. B. MARINI-BETTOLO UND J. A. COCH-FRUGONI, *Gazz. chim. ital.*, 86 (1956) 1324.
[76] G. B. MARINI-BETTOLO UND M. LEDERER, *Nature*, 174 (1954) 133; G. B. MARINI-BETTOLO, M. LEDERER, M. A. IORIO UND A. PIMENTA, *Rend. ist. super. sanità*, 18 (1955) 898.
[77] R. MARKHAM UND J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 52 (1952) 552, 558.
[78] H. J. MCDONALD, *Ionography*, Year Book Pubs., Chicago, 1955.
[79] H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 82 (1951) 489.
[80] H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 82 (1951) 944.
[81] H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 83 (1952) 210.
[82] H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 83 (1952) 737.
[83] H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 85 (1954) 1240.
[84] H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 85 (1955) 1251.
[85] H. MICHL, *Chem. Ingr. Tech.*, 27 (1955) 624.
[86] H. MICHL, *Mikrochim. Acta*, (1956) 54.
[87] H. MICHL, unveröffentlichte Versuche.
[88] H. MICHL UND F. HABERLER, *Monatsh. Chem.*, 85 (1954) 779;
H. MICHL UND H. KUHN, *Fachliche Mitt. Österr. Tabakregie*, (1954) 14.
[89] H. MICHL UND H. KUHN, *Fachliche Mitt. Österr. Tabakregie*, (1954) 10.
[90] H. MICHL, H. KUHN UND H. BÜHN, *Fachliche Mitt. Österr. Tabakregie*, (1956) 1.
[91] H. MICHL, K. RIEDL UND F. WESSELY, *Monatsh. Chem.*, 82 (1951) 539.
[92] G. G. NEWTON UND E. P. ABRAHAM, *Biochem. J.*, 58 (1954) 103.
[93] H. G. NÖLLER, *Klin. Wochschr.*, 32 (1954) 988.
[94] F. OEHME UND I. RAUSCHENBACH, *Chem. Tech. (Berlin)*, 8 (1955) 1.
[95] PHYWE A. G., *D.P.* 718,617 vom 3.12.1954.
[96] J. PORATH, *Nature*, 175 (1955) 478; *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 151.
[97] Z. PUCAR, *Arhiv kem.*, 25 (1953) 205.
[98] Z. PUCAR, *Arhiv kem.*, 26 (1954) 29, 41.
[99] H. M. RAUEN, *Biochemisches Taschenbuch*, Springer Verl., Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1956.
[100] R. R. REDFIELD UND C. B. ANFINSEN, *J. Biol. Chem.*, 221 (1956) 385.
[101] A. P. RYLE UND C. B. ANFINSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 633.
[102] A. P. RYLE, F. SANGER, L. F. SMITH UND R. KITAI, *Biochem. J.*, 60 (1955) 541.
[103] H. SAECHTLING UND W. ZEBROWSKI, *Kunststoff-Taschenbuch*, 12. Aufl., Carl Hanser, München, 1956.
[104] I. SANO UND H. KAJITA, *Klin. Wochenschr.*, 33 (1955) 956.
[105] T. R. SATO, H. DIAMOND, W. P. NORRIS UND H. H. STRAIN, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 6154.
[106] F. SCHEFFER, W. ZIECHMANN, H. D. BECKER UND H. SCHLÜTER, *Naturwissenschaften*, 42 (1955) 71; *Z. Pflanzenernähr., Düng. u. Bodenk.*, 70 (1955) 260.
[107] O. SCHIER, *Angew. Chem.*, 68 (1956) 63.
[108] L. SCHMID, H. MICHL UND G. ZWETTLER, *Monatsh. Chem.*, 82 (1951) 526.
[109] G. SCHNEIDER UND G. SPARMANN, *Naturwissenschaften*, 42 (1955) 156, 391.
[110] E. SCHUMACHER, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 221;
E. SCHUMACHER UND H. J. STREIFF, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 228, 234.
[111] H. J. SILBERMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 647.
[112] J. D. SMITH UND R. MARKHAM, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 350.

[113] O. SMITHIES, *Nature*, 175 (1955) 307; *Biochem. J.*, 61 (1955) 629.
[114] O. SMITHIES UND M. D. POULIK, *Nature*, 177 (1956) 1033.
[115] G. A. SPENGLER UND M. KNEDEL, *Klin. Wochschr.*, 34 (1956) 389.
[116] H. STEGEMANN, *Naturwissenschaften*, 43 (1956) 518.
[117] M. STEINER UND E. MAAS, *Naturwissenschaften*, 44 (1957) 90.
[118] H. STERZ UND W. KLEMENTSCHITZ, *Wiener klin. Wochschr.*, 64 (1952) 103.
[119] H. SVENSSON, *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.*, A 22, No. 10 (1946).
[120] H. THIES UND G. KALLINICH, *Biochem. Z.*, 324 (1953) 485.
[121] H. TUPPY UND H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 84 (1953) 1011.
[122] F. TURBA, *Chromatographische Methoden in der Protein Chemie*, Springer Verl., Berlin, Göttingen und Heidelberg, 1954, S. 334.
[123] F. TURBA UND H. ESSER, *Angew. Chem.*, 65 (1953) 256; *Biochem. Z.*, 327 (1955) 93.
[124] F. TURBA UND H. HETZEL, *Biochem. Z.*, 325 (1954) 524.
[125] F. TURBA, H. PELZER UND H. SCHUSTER, *Z. physiol. Chem.*, 296 (1954) 97.
[127] B. M. TURNER, *Nature*, 179 (1957) 964.
[128] H. E. WADE UND D. M. MORGAN, *Biochem. J.*, 60 (1955) 264.
[129] J. DE WAEL, *Chem. Weekblad*, 49 (1953) 229.
[130] R. WEBER, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 2031.
[131] R. WEBER, *Helv. Chim. Acta*, 36 (1953) 424.
[132] W. C. WERKHEISER UND R. J. WINZLER, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 971.
[133] G. WERNER, *Rec. trav. chim.*, 74 (1955) 613.
[134] G. WERNER UND O. WESTPHAL, *Angew. Chem.*, 67 (1955) 251, die hier beschriebene Apparatur wird von der Dr. Virus K.G., Bonn, in den Handel gebracht.
[135] O. WESTPHAL UND O. LÜDERITZ, *Angew. Chem.*, 66 (1954) 407.
[136] O. WESTPHAL, O. LÜDERITZ, B. KICKHÖFEN, E. EICHENBERGER UND W. KEIDERLING, *Rev. canad. biol.*, 12 (1953) 289.
[137] T. WIELAND, *Angew. Chem.*, 60 (1948) 313.
[138] T. WIELAND UND U. FELD, *Angew. Chem.*, 63 (1951) 258.
[139] T. WIELAND UND E. FISCHER, *Naturwissenschaften*, 35 (1948) 29.
[140] T. WIELAND UND G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.*, 67 (1955) 257.
[141] T. WIELAND UND G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.*, 69 (1957) 199.
[142] T. WIELAND UND W. SCHÖN, *Ann. Chem.*, 593 (1955) 157.
[143] C. WUNDERLY, *Die Papierelektrophorese*, Verl. Sauerländer, Aarau und Frankfurt, 1954.
[144] C. WUNDERLY, *Chimia (Schweiz)*, 10 (1956) 1.
[145] H. ZENTNER, *Nature*, 175 (1955) 953.
[146] C. A. ZITTLE, *Advances in Enzymol.*, 12 (1951) 493.

Eingegangen den 2. November 1957

ÜBERSICHT

CHROMATOGRAPHIE VON STERINEN, STEROIDEN UND VERWANDTEN VERBINDUNGEN*

TEIL A

R. NEHER

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel (Schweiz)

INHALTSÜBERSICHT

I. Einleitung 123
II. Nomenklatur, Stereoisomerie und Strukturformeln typischer Steroide 124
III. Säulenchromatographie 127
A. Adsorptionschromatographie 128
1. Ausführungsformen 128
2. Adsorbentien 129
3. Lösungsmittel 133
4. Apparatives 134
5. Bereitung der Säule 135
6. Durchführung der Chromatographie 136
7. Beschreibung der Chromatogramme 139
8. Spezielle Beispiele 139
(a) Sterine 139
(1) an Al_2O_3 139
(2) an Silicagel oder Kieselsäure 140
(3) an Aluminiumsilikat 140
(4) an Florisil 140
(b) Steroide 140
(1) an Al_2O_3 140
(2) an Silicagel 145
(3) an Magnesiumsilikat 147
(4) an Kohle 147
(c) Oestrogene 147
(d) Glykoside und Aglykone 148
(e) Sapogenine 148
(f) Gallensäuren 149
(g) Steroid-Konjugate 149
9. Nebenreaktionen von Steroiden mit dem Adsorbens 150
10. Konstitution und chromatographisches Verhalten (Elutionsreihenfolge) 152
B. Verteilungschromatographie 154
1. Ausführungsformen 154
2. Träger 155
3. Lösungsmittel 156
4. Apparatives 156
5. Bereitung der Säule 157
6. Durchführung der Chromatographie 159
7. Beschreibung der Chromatogramme 160
8. Spezielle Beispiele 160
(a) Sterine 160

* Der Literaturnachweis befindet sich am Schluss von Teil B, im nächsten Heft dieser Zeitschrift. Literaturziffern in eckigen Klammern.

Literatur S. 252/258.

(b) Steroide 160
(c) Oestrogene 161
(d) Glykoside und Aglykone 161
(e) Gallensäuren 164
(f) Verwandte Verbindungen 164
9. Schlussbemerkungen 165

I. EINLEITUNG

Die verschiedenen chromatographischen Methoden, zuerst die Adsorptions-, später die Verteilungschromatographie, sind heute für jeden, der mit Steroiden zu tun hat, zum unersetzlichen Hilfsmittel für die Isolierung, Trennung, Reinigung und Bestimmung dieser Stoffe geworden. Auf die überragende Bedeutung und vortreffliche Nützlichkeit dieser sowohl präparativ als auch qualitativ und quantitativ analytisch anwendbaren Trennmethode für extraktive oder synthetische Arbeiten braucht hier nicht weiter hingewiesen zu werden. Beispiele hiefür finden sich später in den speziellen Abschnitten. Es sei lediglich erwähnt, dass durch geeignete Kombination von Adsorptions- und Verteilungschromatographie nahezu sämtliche Gemische auf schonendste Weise und ohne wesentliche Verluste auf rein physikalischem Wege ohne jegliche chemische Reaktionen getrennt werden können, was speziell für labile Verbindungen oder solche mit noch unbekannten Eigenschaften von Bedeutung ist. Für andere komplizierte Trennungen kann aber auch gerade die Kombination chromatographischer Methoden mit chemischen Reaktionen von Vorteil sein. Alle chromatographischen Methoden sind bei hoher Trennwirkung im Prinzip sehr einfach in apparativer Ausstattung und Durchführung, welche für Spezialfälle bis zu einem hohen Grad automatisiert werden kann. Der diskontinuierliche Arbeitsvorgang stellt für Laboratoriumsarbeiten auf dem Steroidgebiet keinen Nachteil dar, können doch Mengen von Bruchteilen eines Mikrogramms bis etwa 100 g pro Operation chromatographiert werden. Allerdings ist bei grösseren Mengen mit einem bedeutenden Aufwand an Lösungsmitteln zu rechnen. Zur Anwendung der Chromatographie im technischen Masstab vergleiche [1].

Die allgemeine theoretische und apparative Seite von Adsorptions- und Verteilungschromatographie ist bereits an anderer Stelle ausführlich beschrieben (vgl. [2–13, 80]). Nur die für Steroide speziell geeignete oder bewährte apparative Ausrüstung wird hier erwähnt. Im übrigen ist es der Zweck dieses Referates, die für die praktische Arbeit wesentlichen und erprobten Methoden ausführlich wiederzugeben, typische Beispiele anzuführen und die Zusammenhänge zwischen Konstitution und chromatographischem Verhalten zu diskutieren, wobei die Literatur bis September 1957 berücksichtigt wurde.

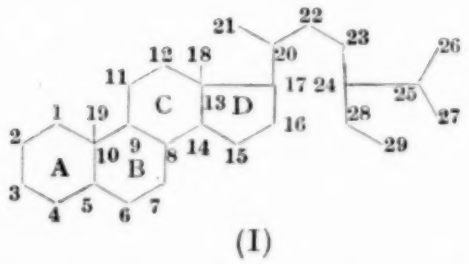
Aus praktischen Gründen wird zuerst die Säulenchromatographie (Adsorption und Verteilung), dann die eigentliche Papierchromatographie (im wesentlichen Verteilung) behandelt. Auf Jonenaustausch und Elektrochromatographie kann in dieser Übersicht verzichtet werden, da es sich bei den Steroiden in der Hauptsache um neutrale Stoffe handelt. Auch dort wo saure (Oestrogene, Carbonsäuren) oder basische (Steroidalkaloide) Vertreter vorliegen sind die letztgenanten Methoden kaum

erprobt worden, da auch hier auf Adsorption oder Verteilung beruhende Verfahren befriedigende Resultate liefern. Gaschromatographische Methoden sind bisher wegen der geringen Flüchtigkeit der Steroide nicht zur praktischen Anwendung gelangt.

II. NOMENKLATUR, STEREOISOMERIE UND STRUKTURFORMELN TYPISCHER STEROIDE

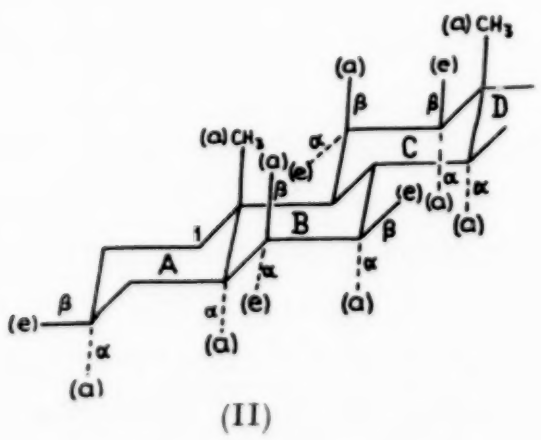
Zu der üblichen Nomenklatur chromatographischer Eigenschaften, methodischer Details oder Arbeitsprozesse sei hier nur auf die oft gebrauchten Wörter polar und unpolar (oder nicht polar) im Zusammenhang mit Adsorbentien, Lösungsmitteln oder Steroiden hingewiesen; "polar" hat hierbei immer den Sinn von hydrophil und "nicht polar" von hydrophob oder lipophil.

Die Nomenklatur der Steroide folgt den international empfohlenen Richtlinien [14], wobei folgende Punkte hervorgehoben seien: Die Steroide werden entsprechend Formel I numeriert:

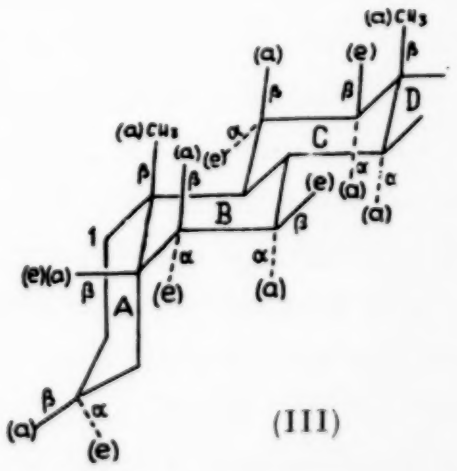


(I)

Die dekalinartige Verknüpfung der hydrierten Kohlenstoffringe gibt zu einer grossen Anzahl von räumlichen Isomeren Anlass. Bei allen natürlichen Steroiden ist das Ringpaar B/C immer und das Ringpaar C/D meistens *trans*-verknüpft (eine *cis*-Verknüpfung von C/D findet sich lediglich in den Cardenoliden und Bufadienoliden). Die Ringe A und B sind etwa gleich häufig sowohl *cis*- als auch *trans*-verknüpft. Ein deutlicheres Bild hiervon geben die Raumformeln II und III, wobei zur eindeutigen



(II)



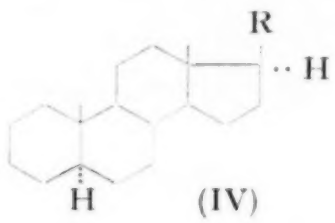
(III)

Beschreibung des räumlichen Baues die Richtungen der Valenzen der Ringkohlenstoffatome auf die anguläre Methylgruppe am C-Atom 10 bezogen werden [82]. Diese wird übereinkunftsgemäss als *über* der Vierringebene stehend angenommen und ihre Bindung durch eine ausgezogene Linie dargestellt. Diese Lage wird als β-Stellung bezeichnet, die umgekehrte, nach unten weisende, als α-Stellung (gestrichelt gezeichnet). Die entsprechenden C-H-Bindungen sind in den Formelbildern II und III lediglich in Stellung 3, 5, 6, 7, 11, 12 und 14 eingezeichnet. An diesen C-Atomen ist

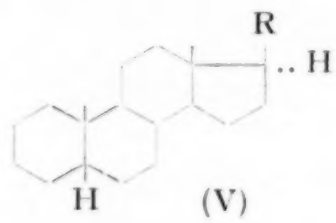
gleichzeitig auch der Index e (equatorial) oder a (axial) angegeben, der die räumliche Lage der extracyclisch gebundenen Substituenten mit ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften korrelationiert [15, 16].

So erweisen sich z.B. die Hydroxylgruppen in equatorialer Stellung (also radial zur Hauptsymmetrieachse der Cyclohexanringe) bei der Verteilungschromatographie immer als polarer als diejenigen in axialer Stellung (parallel zur Hauptsymmetrieachse der Cyclohexanringe). Bei 3-Hydroxyverbindungen ist daher je nach Verknüpfung der Ringe A/B einmal das α-Isomere (A/B *cis* III), ein andermal das β-Isomere (A/B *trans* II) in equatorialer und damit in physikalisch-chemischer Hinsicht gleichwertiger Stellung.

Zur Bezeichnung der in diesem Referat oft erwähnten Kohlenwasserstoffe IV und V werden folgende acht Namen benützt (Tab. 1).



(IV)



(V)

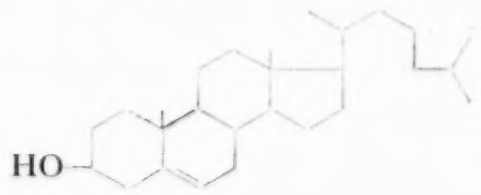
TABELLE 1

	IV 5α-Reihe	*V 5β-Reihe*
R = H	Androstan	Testan
R = $-C_2H_5$	Allopregnan	Pregnan
R = $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$	Allocholan	Cholan
R = $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH(CH_3)_2$	Cholestan	Koprostan

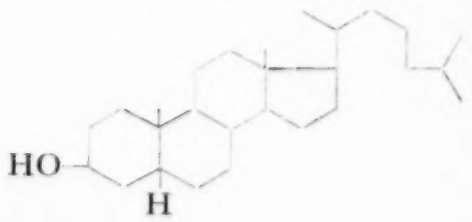
Die Seitenkette am C_{17} der natürlichen Steroide steht im allgemeinen in β-Stellung. Im umgekehrten Fall benützt man die Bezeichnung 17α, z.B. 17α-Pregnan.

Im folgenden finden sich die Strukturformeln einiger typischer Vertreter der Sterine, Steroide und verwandten Verbindungen mit ihren Trivialnamen (das Wasserstoffatom am C-Atom 14 befindet sich immer in α-Stellung, wenn es nicht eingezeichnet ist):

Sterine

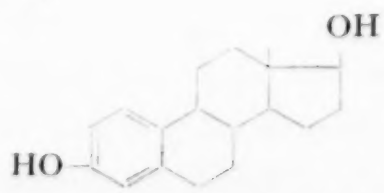


Cholesterin

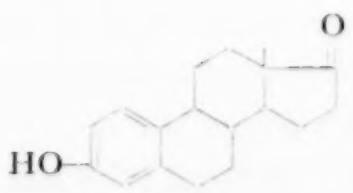


Koprosterin [Koprostanol(3β)]

C_{18}-Steroide (Oestrogene)

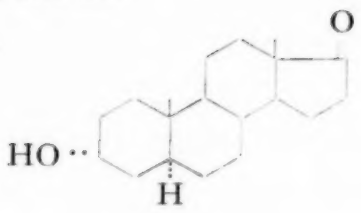


Oestradiol(17β)

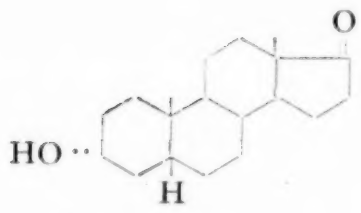


Oestron

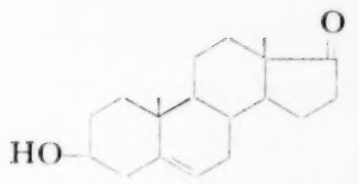
C_{19}-Steroide



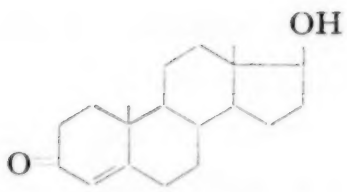
Androsteron



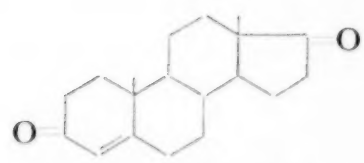
Testanol(3*a*)-on(17)
(früher Etiocholanolon)



Dehydroepiandrosteron
(Dehydroisoandrosteron)

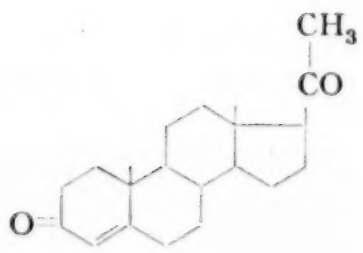


Testosteron

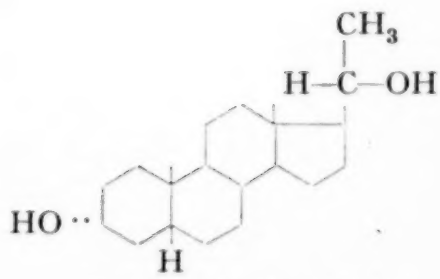


Δ^4-Androstendion(3,17)

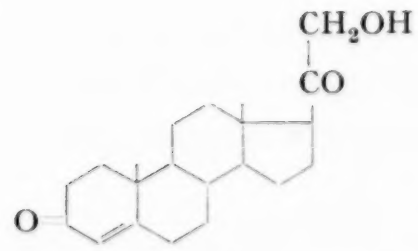
C_{21}-Steroide



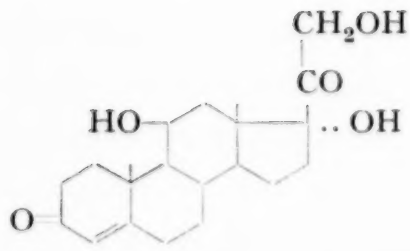
Progesteron



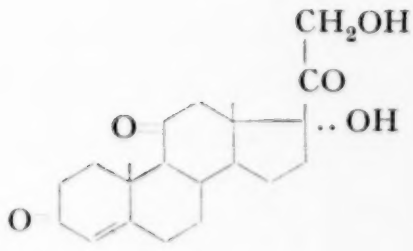
Pregnandiol(3*a*,20*a*)



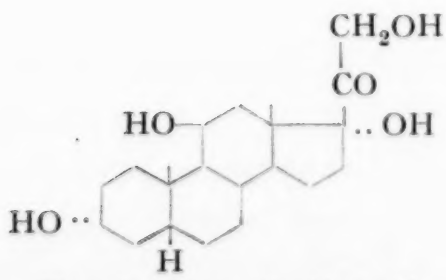
Cortexon (11-Desoxycorti-
costeron, DOC)



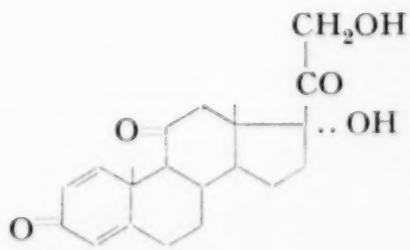
Cortisol (Hydrocortison,
Reichstein's M, Kendall's F)



Cortison



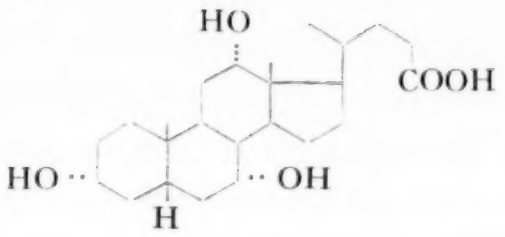
Tetrahydrocortisol(3*a*,5*β*)
[Pregnantetrol(3*a*,11*β*,17*a*,21)-on(20)]



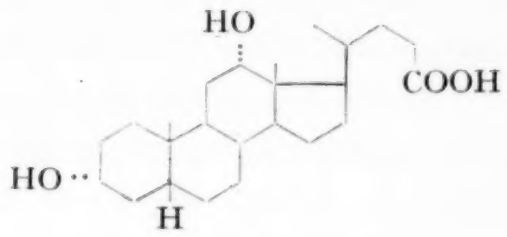
Prednison (1-Dehydrocortison)

Literatur S. 252/258.

Gallensäuren

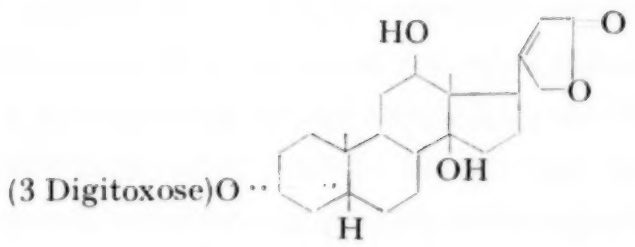


Cholsäure

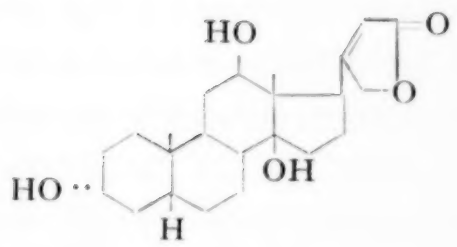


Desoxycholsäure

Cardenolide

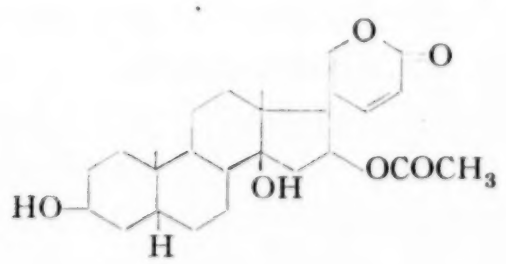


Digoxin (Glycosid)



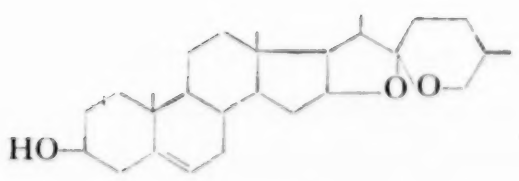
Digoxigenin (Aglucon)

Bufadienolide



Bufotalin

Sapogenine



Diosgenin

III. DIE SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Diese Art der Chromatographie ist in erster Linie für präparative Zwecke geeignet, wird aber auch häufig für qualitative und quantitative analytische Trennungen bis hinunter zu kleinsten Mengen benützt. Hierbei bedient man sich entweder der Adsorption (fest–flüssig) oder der Verteilung (flüssig–flüssig), indem man ein Gemisch in einem geeigneten Lösungsmittel durch eine senkrecht angeordnete Säule eines Lösungsmittels (stationäre Phase) passieren lässt. Haben die Bestandteile des Gemisches in einem solchen System verschiedene Adsorptions- oder Verteilungs-

koeffizienten, so trennen sich die einzelnen Substanzen infolge ihrer verschiedenen Wandergeschwindigkeit auf. In der Trennfähigkeit von Adsorptionschromatographie einerseits und Verteilungschromatographie anderseits bestehen hinsichtlich struktureller oder räumlicher Isomerie der Steroide im allgemeinen keine grossen Unterschiede. Eine Ausnahme bildet z.B. die isolierte Doppelbindung, deren Einfluss bei der Adsorption etwas grösser ist als bei der Verteilung. Ob für einen bestimmten Zweck Adsorptions- oder Verteilungschromatographie gewählt werden soll, ist abgesehen von der Trennbarkeit in erster Linie folgendes zu beachten. Für die Adsorptionschromatographie eignen sich stark polare Steroide mit Carboxylgruppe oder mehreren Hydroxylgruppen nur in veresterter Form, z.B. als Acetate oder Methylester, oder aber, wenn schwach aktive Adsorbentien gewählt werden. Ferner können labile Verbindungen durch verschiedene Adsorbentien relativ leicht verändert werden, und es ist zu berücksichtigen, dass die meisten Stoffe im adsorbierten Zustand gegen Sauerstoff und Licht empfindlicher sind als in Lösung. Die erwähnten Einschränkungen gelten nicht für die Verteilungschromatographie; hier ist das Arbeiten mit freien Verbindungen gegenüber den Estern sogar vorteilhaft, da die Polaritätsunterschiede der letzteren weniger ausgeprägt sind. Die Adsorptionschromatographie hat aber den Vorteil der einfacheren und bedeutend schnelleren Durchführung als die Verteilungschromatographie, ausserdem bedarf letztere pro Gramm aufzutrennendes Gemisch in der Regel etwa das 10–30fache Säulenvolumen gegenüber der ersteren. Für die Auswahl hat man also zu berücksichtigen:

1. Polarität oder Labilität der Substanz.
2. Trennbarkeit.
3. Aufwand an Zeit und Material.

A. ADSORPTIONSCHROMATOGRAPHIE

1. Ausführungsformen

Die von TSWETT für farbige Verbindungen angegebene Ausführungsform kann im Prinzip selbstverständlich auch für farblose Substanzen wie die Steroide angewendet werden. Allerdings ist hierbei die direkte Erkennung der einzelnen Zonen nicht möglich. Man hat aber versucht, dies auf verschiedenen Umwegen zu erreichen:

(1) Willkürliche Zerlegung der Säule in kleine Abschnitte und deren Elution.

(2) Hervorrufung von Fluoreszenz der farblosen Verbindungen in der Säule durch Bestrahlung mit UV-Licht.

(3) Beigabe fluoreszierender Stoffe zum Adsorbens, dessen Fluoreszenz dort gelöscht wird, wo Substanzen adsorbiert sind.

(4) Auftragen eines schmalen Streifens eines geeigneten Reagens, z.B. Kaliumpermanganat auf die ausgestossene Säule.

(5) Mitchromatographieren von Farbstoffen mit ähnlichen Adsorptionskoeffizienten wie die zu trennenden Steroide.

(6) Überführung der Steroide in gefärbte Derivate wie Dinitrophenylhydrazone

für Ketone, Azobenzoyl-*p*-carboxyl-ester [17] für phenolische Steroide, Azoylderivate für Steroide mit reaktiven Hydroxylgruppen [18] oder für Gallensäuren [19, 21, 24].

(7) Neuerdings besteht auch die Möglichkeit, Steroide z.B. mit ^{131}J-hältigem *p*-Jodbenzoylchlorid in radioaktive Ester überzuführen und ihre Lage in der Säule mit einem Zählrohr festzustellen [20, 119].

Die meisten dieser Methoden sind allerdings mit so vielen Nachteilen behaftet, dass sie sich kaum durchgesetzt haben. Als Methode der Wahl, die heute fast ausschliesslich in der Adsorptionschromatographie von Steroiden (und den meisten anderen farblosen oder gefärbten Verbindungen) verwendet wird, hat sich diejenige der *fraktionierten Elution* bewährt, die besonders von den Schulen REICHSTEIN und RUZICKA eingeführt wurde. Hierbei werden die adsorbierten Stoffe durch eine Reihenfolge geeigneter Lösungsmittel von ständig steigender Elutionskraft an der Säule nicht nur aufgetrennt sondern auch der Reihe nach eluiert. Entweder teilt man das Eluat mehr oder weniger willkürlich oder auf Grund von Vorversuchen in eine Reihe von Fraktionen, oder aber man verfolgt das Erscheinen der gelösten, farblosen Stoffe:

(a) an der Schlierenbildung;

(b) durch Auskristallisieren von Substanz am Austropfrohr nach Anblasen;

(c) durch Gewichtsbestimmung nach Abdampfen oder Abdestillieren des Lösungsmittels;

(d) durch Farbreaktionen;

(e) spektrophotometrisch;

(f) durch Messung der Radioaktivität etc.

Als gebräuchlichste Methode kann die Gewichtsbestimmung gelten. Wie im einzelnen vorzugehen ist, wird weiter unten bei der Beschreibung der Durchführung angegeben. Auch bei gefärbten Steroidderivaten ist es weitaus am vorteilhaftesten, sich der fraktionierten Elution zu bedienen. Letztere kann weiterhin sinnvoll mit der sogenannten Methode der gradient elution oder der Verdrängungschromatographie kombiniert werden.

2. Adsorbentien

Für die Steroidchromatographie eignen sich in erster Linie homogene, hydrophile Adsorbentien, wie Aluminiumoxyd, Magnesiumsilikat, Silicagel oder Kieselsäure oder Mischungen der letzteren mit Kieselgur, wobei die Aktivität der Adsorbentien in der genannten Reihenfolge abnimmt; gelegentlich kommt auch Magnesiumcarbonat [21], Aluminiumsilikat [22, 23] oder Kohle (hydrophobes Adsorbens! [25, 26]) in Frage. Eine feinere Abstufung lässt sich durch Mischen verschiedener aktiver Adsorbentien oder besonders durch stufenweise Aktivierung bzw. Entaktivierung eines Adsorbens erreichen. Teilweise entaktivierte Präparate sind den hochaktiven oft vorzuziehen, da sie in ihrem Adsorptionsvermögen durch Absättigung der aktivsten Zentren wesentlich gleichmässiger sind, bei der Elution der adsorbierten Substanzen geringere Tendenz zur Schwanzbildung (tailing) zeigen und daher im Endeffekt

Literatur S. 252/258.

bessere Trennungen ergeben. Eine Aktivierung der hydrophilen Adsorbentien erreicht man in der Regel durch Erhitzen (Befreiung von Wasser) und eine Entaktivierung durch Zugabe bestimmter Mengen von Wasser. Die Adsorption ist umso besser je feiner die Teilchengrösse ist. Ist letztere sehr klein, so nimmt die Filtrationsgeschwindigkeit stark ab, was man durch Mischen des Adsorbens mit einem nur schwach adsorbierenden Füllmaterial (Kieselgur) korrigieren kann. Als Mass für die Teilchengrösse wird häufig die Sieb-No. oder Maschenzahl angegeben, d.h. die Maschenzahl pro cm eines Siebes, das das Adsorbens eben noch passieren lässt. Dabei entsprechen 100 Maschen pro cm ungefähr einer Korngrösse von maximal 0.05 mm; als anglo-amerikanisches Äequivalent dient der Ausdruck mesh/inch.

Für die Auswahl geeigneter Adsorptionsmittel hat man die Polarität und chemische Labilität der zu trennenden Steroide zu berücksichtigen. Hydrophile Adsorbentien adsorbieren ein Molekül umso stärker je mehr polare Gruppen es besitzt und je ungesättigter es ist (besonders wenn konjugiert ungesättigt), d.h. schwach polare Verbindungen werden an starken und stark polare an schwachen Adsorbentien chromatographiert.

Die Adsorbierbarkeit nimmt in der Reihenfolge der Gruppen CH=CH, OCH_3, COOR, C=O, CHO, SH, NH_2, OH, COOH zu. Dabei ist natürlich auch das Verhältnis Anzahl C-Atome zur Anzahl polarer Gruppen von Bedeutung; deshalb werden z.B. C_{19}-Diole stärker adsorbiert als C_{21}-Diole. Bei hydrophoben Adsorptionsmitteln wie Kohle, ist die Reihenfolge ungefähr umgekehrt, so dass die schwach polaren Verbindungen aus organischen Lösungsmitteln am stärksten und die stark polaren am schwächsten adsorbiert werden.

Aluminiumoxyd. Aktiviertes und standardisiertes Aluminiumoxyd ist im Handel erhältlich (z.B. Merck, standardisiert nach BROCKMANN, Woelm, Eschwege, basisch und alkalifrei). Gleichwertige und sehr aktive Präparate erhält man durch Erhitzen von technisch reinem Aluminiumhydroxyd unter Rühren auf 380–400° während 3 Stunden. Solche Präparate, die sehr hygroskopisch sind und durch Stehen an der Luft rasch Wasser aufnehmen, enthalten immer freies Alkali und geben gute Trennungen. Für bestimmte Zwecke ist dieses Aluminiumoxyd zu aktiv oder zu alkalisch und führt zu Kondensationen von Ketonen oder Aldehyden, Abspaltung von Hydroxylgruppen etc. [27].

Entaktivierung. Durch Stehenlassen an der Luft und Feststellen und Standardisieren der abgeschwächten Aktivität durch Adsorption ausgewählter Farbstoffe nach BROCKMANN UND SCHODDER [28] (Aktivitätsstufen I–V). Dieses etwas langwierige Verfahren kann dadurch vereinfacht werden, dass man zu voll aktiviertem (wasserfreiem) Aluminiumoxyd in einem Glasgefäss die in Tabelle 2 angegebenen Mengen Wasser zufügt und solange schüttelt, bis die Masse homogen geworden ist (etwa nach 2 Stunden) und die angegebene Aktivitätsstufen I–V erreicht hat [29].

Sehr häufig wird mit Aktivitätsstufen II–III gearbeitet. Bei anderen einfachen Entaktivierungsmethoden equilibriert man Aluminiumoxyd über einer gesättigten Lösung von $NaBr.2H_2O$ für ca. 5 Tage, worauf das Aluminiumoxyd 7–8% Wasser aufgenommen hat [30], oder über 58%iger Schwefelsäure während 3 Wochen unter

mehrmaligem Wechsel der Säure bis sich ihre Konzentration nicht mehr geändert hat [31]. Ferner erhält man auch durch gründliches Mischen von Aluminiumoxyd verschiedener Aktivität ein Präparat von gewünschter mittlerer Aktivitätsstufe. Um Wassergehalt und damit Aktivitätsstufen von Aluminiumoxyd konstant zu halten ist das Adsorbens stets in gut verschlossenem Gefäss aufzubewahren. Aus dem gleichen

TABELLE 2

AKTIVITÄTSSTUFEN VON Al_2O_3 UND WASSERGEHALT [29]

Wasserzusatz in %	*Aktivitätsstufen nach Brockmann und Schodder* [28]	
0	I	hoch aktiv
3	II	
6	III	
10	IV	
15	V	schwach aktiv

Grund müssen die zur Chromatographie verwendeten Lösungsmittel wasserfrei sein.

Alkalifreies Aluminiumoxyd wird für empfindliche Stoffe wie Aldehyde, Ketone, Laktone, leicht hydrolysierbare Ester usw. verwendet. Solche, nur noch schwach alkalisch reagierende Präparate (pH 7.5–8) sind ebenfalls im Handel erhältlich (z.B. Woelm). Für die Herstellung im Laboratorium kocht man gewöhnliches Aluminiumoxyd wiederholt mit destilliertem Wasser aus bis das Filtrat neutral ist. Das abfiltrierte Aluminiumoxyd wird mit Methanol gewaschen und im Vakuum (10 mm) bei 160–200° reaktiviert. Bei 200–210° reaktivierte Präparate sind für viele Zwecke zu aktiv und gewöhnlich wird eine Temperatur von 180° genügen [27]. Im übrigen kann eine stufenweise Entaktivierung wie oben beschrieben ausgeführt werden. Eine Neutralisation von alkalischem Aluminiumoxyd kann natürlich schneller durch Säure erreicht werden, indem man eine wässerige Suspension mit verdünnter Salpetersäure neutralisiert, mit destilliertem Wasser auskocht, und weiter wie oben behandelt. Ein solches Produkt enthält aber Nitrationen, die nicht immer harmlos sind! Die Verwendung von Salzsäure, Schwefelsäure oder Essigsäure ist nur selten empfehlenswert.

Regeneration. Wenn nötig, kann gebrauchtes Aluminiumoxyd durch wiederholte Extraktion mit kochendem Methanol und Wasser (eventuell unter Zugabe von etwas NaOH), Waschen mit Methanol und Erhitzen regeneriert werden. Eine leichte Verfärburg spielt hierbei keine Rolle.

Magnesiumsilikate sind im Handel unter diesem Namen (z.B. No. 34 der Philadelphia Quartz Comp., Berkeley, Calif.) oder z.B. als Florisil (60–100 mesh, Floridin Co., Clarendon, Pa.) erhältlich und werden meist mit Kieselgur 1:1 oder 2:1 vermischt verwendet. Für die Bereitung der letzteren Mischung geben REICHSTEIN *et al.* [32] eine ausführliche Vorschrift. Magnesiumsilikat, sofern nicht neutral reagierend, wird in Wasser suspendiert und mit Essigsäure bis zur knapp lackmussauren Reaktion versetzt, dann auf der Nutsche zuerst gründlich mit heissem destilliertem Wasser gewaschen bis letzteres neutral abläuft, anschliessend zweimal mit Methanol ausgekocht und schliesslich bei 200° (ohne Vakuum) getrocknet. Kieselgur (z.B. Celite

No. 545, Johns Manville, International Corp., New York) wird mit Wasser, dann mit Methanol ausgekocht und bei 110° (ohne Vakuum) getrocknet. Zwei Gewichtsteile Magnesiumsilikat werden mit einem Gewichtsteil Kieselgur gut vermischt als Adsorbens ("Silikatgemisch") verwendet. SAMUELS *et al.* [33, 34] verwenden entweder eine 1:1 Mischung von Magnesiumsilikat–Celite oder Florisil. Zuerst wird mehrere Stunden mit 95% igem Äthanol, dann mit abs. Alkohol gewaschen. Nach 24stündigem Trocknen bei 120° wird 4 Stunden bei 600° aktiviert und trocken über Silicagel aufbewahrt. Nach mehrtägigem Stehen wird am besten wieder 24 Stunden bei 120° dehydratisiert, sofern mit hoher Luftfeuchtigkeit zu rechnen ist.

Silicagel (Kieselsäuregel). Gute Handelsprodukte können direkt als Adsorbens verwendet werden, wenn z.B. ein Teil, in 100 Teilen Wasser suspendiert, ein klares und neutrales Filtrat ergibt. Sollte letzteres sauer reagieren, wäscht man mit destilliertem Wasser bis ein neutrales Filtrat erhalten wird. Für spezielle Zwecke wäscht man vorher noch mit organischen Lösungsmitteln bis letztere keinen Rückstand mehr enthalten. Um stets gleich aktive Präparate zu haben, erhitzt man sie vor Gebrauch vorteilhaft 24 Stunden auf 120°, wodurch volle Aktivierung erreicht wird (Abkühlen im Exsikkator). Sehr häufig gelangt Silicagel Davison, through 200, No. 923 oder 922 (feinkörniger) zur Verwendung (Davison Chemical Corp., Baltimore, Md.). Kieselsäure Mallinckrodt nach RAMSAY UND PATTERSON ist ebenfalls geeignet [125]. Gewisse Steroide werden durch völlig wasserfreies Silicagel teilweise zerstört oder verändert [120].

Entaktivierung. Neuerdings haben sich nach CAHNMANN teilweise entaktivierte Präparate [35, 120] für die Chromatographie polarer Steroide, wie z.B. Corticosteroide, gut bewährt [36]. Wie bei Aluminiumoxyd geschieht auch bei Silicagel die Entaktivierung durch Wasserzugabe: Zuerst wird das Silicagel voll aktiviert (24 Stunden 120°) und dann mit der gewünschten Menge Wasser versetzt und einige Stunden im verschlossenen Gefäss bis zur Homogenität gut durchgemischt. Eine Standardisierung nach Stufen wird hier nicht benötigt, man gibt einfach den Wassergehalt an. Letzteren wählt man etwa zwischen 5–25%. Präparate mit 15-20% Wasser ergaben bei Corticosteroiden gegenüber voll aktiviertem Silicagel bessere Trennungen und geringere Schwanzbildung [36]. Mischungen von wasserfreiem und stark wasserhaltigem Silicagel ergeben nach wenigen Stunden ohne weiteres homogene Präparate mittleren Wassergehaltes. Mischungen mit Kieselgur ergeben höhere Filtrationsraten.

Regeneration [37]. Man kocht das bereits gebrauchte Silicagel mit der 5–10-fachen Menge 1%iger Natronlauge während ½ Stunde und prüft, ob das Gemisch auf Phenolphtalein noch stark alkalisch reagiert; falls nicht, fügt man die erforderliche Menge 1%iger Natronlauge hinzu. Man filtriert noch heiss und wäscht dreimal mit destilliertem Wasser; dann lässt man mit der 3–6-fachen Menge 5%iger Essigsäure ½ Stunde aufkochen, filtriert, wäscht mit destilliertem Wasser bis das Filtrat neutral reagiert, trocknet bei 120° und siebt durch ein Sieb (No. 80) ab.

Aktivkohle. Für dieses, für die Steroidchromatographie allerdings wenig gebräuchliche Adsorptionsmittel sind im Handel zahlreiche Präparate erhältlich (z.B. Darco G-60, Mallinckrodt, Activated N.F.). Es wird als solches, vermischt mit Kieselgur oder nach Waschen mit verd. Salzsäure und Kaliumcyanidlösung, verwendet [38, 25, 26, 39].

Literatur S. 252/258.

3. Lösungsmittel

Die Festigkeit der adsorptiven Bindung ist nicht allein durch das Adsorbens und den adsorbierbaren Stoff bestimmt, sondern auch noch durch das Lösungsmittel. Je stärker dieses selbst festgehalten wird, je mehr es dem gelösten Stoff die aktiven Zentren des Adsorptionsmittels streitig macht, desto schwächer wird dieser gebunden. Die im folgenden angebene sogenannte eluotrope Reihe der Lösungsmittel bedeutet daher zugleich zunehmende Adsorption (des Lösungsmittels) an hydrophilen Adsorbentien, zunehmende Elution von daran adsorbierten Stoffen und zugleich abnehmende Adsorption derselben: Pentan, Petroläther, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Äther, Methylenchlorid, Chloroform, Aceton, Essigester, Propanol, Äthanol, Methanol, Wasser, Essigsäure oder Pyridin. Auf diese Weise lässt sich durch geeignete Kombination von Adsorbens und Lösungsmittel die Stärke der Adsorption sehr fein abstimmen und das beste Milieu für eine optimale Trennung ausfindig machen. Im allgemeinen wird die Adsorptionssäule mit jenem Lösungsmittel bereitet, das dem in der oben angegebenen Reihe befindlichen Lösungsmittel vorhergeht, in welchem das zu trennende Gemisch löslich ist. Für Kohle als hydrophobes Adsorbens gilt annähernd die umgekehrte Reihenfolge wie für die hydrophilen Adsorbentien.

Alle organischen Lösungsmittel sollen nur trocken und frisch destilliert zur Anwendung gelangen. Einige davon sind bereits im Handel als für die chromatographische Analyse geeignet erhältlich.

Pentan und *Petroläther* (Sdp. z.B. 60–80° oder 80–100°), *Tetrachlorkohlenstoff*, *Methylenchlorid* und *Aceton* trocknet man über wasserfreiem Calciumchlorid, filtriert und destilliert.

Benzol wird mit konz. Schwefelsäure mehrmals ausgeschüttelt oder ausgerührt (die Verwendung eines Vibrators ist hierbei sehr nützlich), mit Wasser neutral gewaschen und über Phosphorpentoxyd oder Natriumdraht destilliert.

Äther wird mit Ferrosulfatlösung und Wasser gewaschen, über Calciumchlorid getrocknet und über Natriumdraht destilliert.

Chloroform ist stets durch Alkoholzusatz (1%) stabilisiert und kann in dieser Form oder besser nach Waschen mit Wasser, sorgfältigem Trocknen mit Calciumchlorid, Filtrieren und Destillieren verwendet werden. Diese Behandlung entfernt nur einen Teil des Alkohols, genügt aber, um die Elutionswirkung gegenüber unbehandeltem Chloroform deutlich herabzusetzen. Völlig alkoholfreies Chloroform ist sehr unstabil und für chromatographische Zwecke nicht empfehlenswert.

Essigester muss durch Waschen mit Sodalösung und Wasser von Säure und Alkohol befreit werden; man trocknet mit Calciumchlorid und destilliert.

Im folgenden werden einige, im übrigen recht ähnliche Lösungsmittelreihen angegeben, die sich bei einzelnen Adsorptionsmitteln vielfach bewährt haben. Für *Aluminiumoxyd:* Pentan, Petroläther, Benzol, Äther, Chloroform, Methanol [27]. Hierbei soll nicht direkt von einem zum anderen Lösungsmittel übergegangen werden, um Risse in der Säule und zu grosse Sprünge in der Elutionswirkung zu vermeiden. Man geht so vor, dass man zunächst etwa 10% vom folgenden Lösungsmittel zusetzt,

Literatur S. 252/258.

dieses je nach Bedarf stufenweise auf 20, 30 bis 50% steigert und dann erst zum nächsten, reinen übergeht. Manchmal ist es erforderlich, die Gemische noch viel feiner abzustufen, z.B. 0.5, 1, 2 und 5%, was besonders beim Übergang zu Äther und Methanol angezeigt ist (vgl. Beispiele weiter unten). Es ist darauf hinzuweisen, dass sich viele Lösungsmittel beim Mischen erwärmen; die Mischungen sind daher rechtzeitig zu bereiten, damit sie bei Gebrauch die Säulentemperatur haben. Weiterhin kann auch so vorgegangen werden, dass mit Tetrachlorkohlenstoff, Benzol oder Chloroform begonnen wird, mit sehr kleinen Zusätzen eines stark polaren Lösungsmittels, wie z.B. 0.1% Methanol oder Äthanol, fortgefahren und letzteres langsam auf ca. 5–10% gesteigert wird. Für diese Art der Chromatographie, die nur zwei verschiedene Lösungsmittel verwendet, eignet sich speziell die Anwendung der sogenannten gradient elution, bei der der Anteil des stärker polaren Lösungsmittels nicht stufenweise sondern kontinuierlich erhöht wird. Aceton und Isopropyläther sind bei Aluminiumoxyd zu vermeiden, da sie sich hierbei relativ leicht zu schwer flüchtigen Verbindungen kondensieren. Bei Methanol ist zu berücksichtigen, dass Aluminiumoxyd darin bereits ein wenig löslich ist.

Für *Magnesiumsilikat* sind ganz ähnliche Lösungsmittelreihen verwendet werden, wie z. B. Petroläther–Methylenchlorid–Aceton–Äthanol, Petroläther–Benzol–Äther–Essigester, Benzol–Chloroform–Äthanol oder Chloroform–Alkohol. Auch hier wie bei Silicagel sind die Übergänge stufenweise vorzunehmen.

Für *Silicagel* hat sich z.B. die Reihenfolge Petroläther–Benzol–Äther–Essigester–Aceton–Methanol, Benzol–Methylenchlorid–Chloroform–Aceton–Methanol, Chloroform–Äthanol oder Chloroform–*tert.*-Butanol bewährt. Die Silicagelsäulen erscheinen durchsichtig mit den sauerstoffreien Lösungsmitteln und opak mit sauerstoffhaltigen; sie sind vorsichtig zu behandeln, da sonst leicht Risse auftreten.

4. Apparatives

Die allgemein bekannten, recht einfachen Anordnungen eignen sich ohne weiteres auch für Steroide, so dass hier nicht näher darauf eingegangen werden muss. Meist

TABELLE 3

DIMENSIONEN VON CHROMATOGRAPHIEROHREN [27]

Für x g Al_2O_3	*Innerer Rohrdurchmesser mm*	*Rohrlänge mm*	*Hahnbohrung mm*
1	8	110	3
2	10	130	3
4	13	160	4
8	16	200	4
15	20	250	4
30	25	300	6
60	32	400	6
125	40	500	6
250	50	600	8
500	65	750	8

Literatur S. 252/258.

wird man mit Rohren ohne Kühl- oder Heizmantel auskommen. Sehr gut eignen sich z.B. die von REICHSTEIN UND SHOPPEE [27] angegebenen Rohre (mit eingeschmolzener Sinterglasplatte oder angeschmolzenem Hahn) für verschiedene Mengen Aluminiumoxyd (Tab. 3). Für eine bestimmte Menge Aluminiumoxyd ist ein Rohr so auszuwählen, dass es damit weniger als halb gefüllt ist. Für spezielle Zwecke werden auch dünne und lange Rohre verwendet oder sie werden höher mit dem Adsorbens gefüllt und tragen am oberen Ende eine entsprechende Nachfüllvorrichtung. Als Mikrosäule lassen sich entzweigeschnittene Mikropipetten oder Mikrotropfrohre mit verengertem unteren und erweitertem oberen Teil gut verwenden (ohne Hahn). Selbstverständlich darf für keine Teile, die mit Lösungsmitteln in Berührung kommen Fett verwendet werden.

5. Bereitung der Säule

Um eine gleichmässige, luftfreie *Aluminiumoxydsäule* zu bereiten, hat sich folgendes Vorgehen bewährt [27]: In das Rohr (ohne eingeschmolzene Sinterglasplatte) führt man Watte, eine gut passende Porzellanfilterplatte oder Drahtnetzscheibe ein, gefolgt von einem genau angepassten Rundfilter. Man schliesst den Hahn und füllt das Rohr mit dem ausgewählten Lösungsmittel. Wenn alle Luftblasen entfernt sind, wird eine dünne Schicht hochgereinigten Sandes eingefüllt und mit einem passenden Rundfilter bedeckt. Dann wird das Aluminiumoxyd in feinem Strom unter vorsichtigem Beklopfen des Rohres eingefüllt und absitzen gelassen. Der Hahn wird nun geöffnet, das Lösungsmittel ablaufen gelassen und wiederholt nachgefüllt, bis das Aluminiumoxyd nicht weiter absitzt, wobei das Adsorbens *immer* mit Lösungsmittel bedeckt bleiben muss! Die Säule wird mit einem Rundfilter und Watte, Sand oder Glaskugeln bedeckt, um sie vor Beschädigung durch Aufwirbeln zu schützen. Das Lösungsmittel wird nun ablaufen gelassen bis es gerade noch das Aluminiumoxyd bedeckt und die Säule ist für den Gebrauch bereit. Schwacher positiver Druck kann angewendet werden zur Beschleunigung der Säulenbereitung und für die folgende Chromatographie, z.B. mittels gefilterter Druckluft oder komprimierter Gase über ein Reduzierventil oder durch eine einfache Druckvorrichtung mit Hilfe einer Wassersäule. Bei Verwendung eines Rohres mit eingeschmolzener Sinterglasplatte geht man ähnlich, aber einfacher vor, indem man in das mit Lösungsmittel gefüllte Rohr direkt Aluminiumoxyd auf die Glasplatte einfüllt. Die so bereitete Säule soll frei von Gasblasen, Poren und Rissen sein. Negativer Druck (Saugen am unteren Ende) soll nicht angewandt werden, da dies in Gegenwart leicht flüchtiger Lösungsmittel zu Rissen und Gasblasen führen kann. (Spezielle Ausführungen, wobei durch Durchsaugen von Luft gleichzeitig die Aktivität des Aluminiumoxyds eingestellt wird, vgl. z.B. [40].)

Das Verhältnis von Durchmesser zur Höhe der Säule (nicht des Rohres) variiert in weiten Grenzen von etwa 1:2 bis 1:20, und wird gelegentlich für besondere Zwecke noch kleiner gewählt. Am häufigsten wird jedoch ein Verhältnis zwischen 1:4 und 1:8 angebracht sein. Auch das Verhältnis von Substanz zu Adsorbens (Aluminiumoxyd) kann von etwa 1:20 bis 1:2000 gewählt werden, wobei als Normalwert 1:30

Literatur S. 252/258.

gilt. Verhältnisse von 1:100 bis 1:2500 werden praktisch nur für besondere Routinezwecke, wie z.B. quantitative Analysen von sehr komplexen Harnsteroidgemischen verwendet [31, 40–42]. Hierbei bezieht sich das Verhältnis nicht auf den ganzen zu chromatographierenden Extrakt, sondern meist auf seinen Steroidgehalt. In Kombination mit geeigneten Elutionsmitteln erreicht man dadurch trotz starker Verunreinigung ein sehr konstantes Elutionsvolumen für die verschiedenen Steroide.

Für die Bereitung von *Magnesiumsilikat*-und *Silicagelsäulen* lässt sich das oben beschriebene Verfahren ebenfalls anwenden. Für diese Adsorbentien geht man aber meist besser so vor, dass man in das unten nur mit Watte gleichmässig abgedichtete Rohr eine Aufschlämmung des Adsorbens in dem ausgewählten Lösungsmittel möglichst in einem Guss bei offenem Hahn einfüllt und wie oben beschrieben absitzen lässt und mit einer Schutzschicht bedeckt (auch für Aluminiumoxyd anwendbar). Für die Säulendimensionen für Silicagel und Magnesiumsilikat gelten die gleichen Angaben wie für Aluminiumoxyd; für das Verhältnis von Substanz zu Adsorbens werden in der Regel Werte von 1:30 bis 1:60 benützt, wobei auch hier für besondere Zwecke wesentlich grössere Mengen Adsorbens verwendet werden, nämlich bis 1:200 für Magnesiumsilikat [43, 34] und bis 1:1000 für Silicagel [44]. In einem Fall einer Mikrobestimmung von Blutsteroiden ist letzteres sogar in 100,000-fachem Überschuss in Bezug auf die Steroidmenge angewandt worden [45].

6. Durchführung der Chromatographie

Allgemeines Beispiel mit Aluminiumoxyd [27]: Ein Substanzgemisch wird *ca.* 1–5%ig in jenem Lösungsmittel gelöst, das in der eluotropen Reihe möglichst weit vorne steht (z.B. 1 g in 100 ml Petroläther), sofern die Löslichkeit noch genügend gross ist. Die Lösung wird mit oder ohne schwachem Überdruck durch die Säule (30 g Aluminiumoxyd) percoliert und das Filtrat als Fraktion 1 gesammelt. Weitere Portionen des gleichen Lösungsmittels (100 ml) werden Durchlaufen gelassen und in separaten Fraktionen gesammelt. Letztere werden laufend abdestilliert und gewogen. Sobald das Gewicht einer Fraktion unter 5% der aufgegebenen Substanzmenge sinkt, beginnt man die Elution durch Zusatz des nächst stärkeren eluotropen Lösungsmittels (z.B. 100 ml Petroläther + 10% Benzol) voranzutreiben. Der Zusatz wird stufenweise, wie oben unter dem Abschnitt Lösungsmittel angegeben, und nach Massgabe der Fraktionsgewichte gesteigert bis zum nächsten reinen Lösungsmittel (Benzol) usf., entsprechend der eluotropen Reihe, bis alles eluiert ist. Für die Adsorption von Substanzen, die im ausgewählten Lösungsmittel unlöslich sind, kann man folgendermassen verfahren [27]: Eine Substanz ist z.B. unlöslich in Petroläther und Benzol, jedoch löslich in Chloroform. Die Säule wird mit Benzol bereitet. 1 g der Substanz wird in 10 ml Chloroform gelöst und die Lösung mit 90 ml Benzol verdünnt. Flockt ein Teil aus, so lässt man ihn absitzen und giesst die überstehende Lösung auf die Säule. Das Präzipitat wird wieder in 10 ml Chloroform gelöst und mit 9 ml Benzol versetzt und die Behandlung so lange fortgesetzt, bis alles in Lösung gegangen ist. Wenn dies zu langsam geht, erhöht man die Chloroformkonzentration.

Literatur S. 252/258.

Die angegebenen Bedingungen können innerhalb gewisser Grenzen weitgehend variiert werden (über Säulendimensionen, Verhältnis von Substanz zu Adsorbens und Lösungsmittelreihen siehe oben). Für das Volumen der einzelnen Fraktionen lassen sich keine starren Angaben machen, da diese Grösse von Trennbarkeit, Eluierbarkeit und anderen Bedingungen abhängt. Es erscheint jedoch zweckmässig, das Fraktionsvolumen zur Menge des Adsorbens in Beziehung zu setzen, wobei pro g Adsorbens die 0.4- bis 300-fache Menge Lösungsmittel pro Fraktion verwendet wird. Bei Säulen mittlerer Grösse wird man am besten mit der 2–5-fachen Menge operieren. Mit ein wenig Erfahrung sollte es immer möglich sein, eine Mischung in etwa 15 oder mehr Fraktionen zu zerlegen, von welchen keine mehr als 10% der ursprünglichen Mischung ausmacht. Sind grössere Fraktionen angefallen, so empfiehlt es sich, diese zu rechromatographieren. Für die Chromatographie gibt es theoretisch eine optimale Durchlaufgeschwindigkeit; percoliert die Lösung zu langsam, so können unerwünschte Diffusionserscheinungen auftreten, geht es zu schnell, so sinkt die für den Trenneffekt wichtige Zahl der Einzeladsorptionen. Eine bestimmte Durchlaufgeschwindigkeit in ml/min ist schwer anzugeben, da sie stark von der Säulendimension abhängig ist. Als Minimum kann man die Durchlaufgeschwindigkeit ohne Anwendung von Druck betrachten, als mittleren Wert etwa die 2–3-fache Geschwindigkeit (ca. 2–10 ml/min) durch Anwendung schwachen positiven Druckes, der übrigens während der ganzen Chromatographie möglichst konstant gehalten werden soll. Über eine Vorrichtung zur Bremsung der Durchflussgeschwindigkeit vgl. z.B. [121] und zur Konstanthaltung [123]. Als weiterer Anhaltspunkt diene der Hinweis, dass eine Chromatographie mittlerer Grösse in einem Arbeitstag gut bewältigt werden kann; auf alle Fälle sollte eine längere Unterbrechung vermieden werden. Weniger anspruchsvolle Chromatogramme für Vorreinigungen oder Gruppentrennungen oder gut ausgearbeitete Routineverfahren sind schon in 1 bis wenigen Stunden zu bewerkstelligen. Zur Beschleunigung der Arbeit ist die Verwendung von drei Rundkolben vorteilhaft, die abwechselnd benützt werden: einer für die Sammlung des Eluates, einer für die Destillation und einer für die preliminäre Prüfung des Rückstandes, der sogleich in ein kleines tariertes Koch- oder Reagensglas transferiert wird. Für grössere Mengen als 1 g empfiehlt sich öfters ein Vorversuch mit einer kleinen Probe, wobei Abkürzungsmöglichkeiten des Verfahrens evident werden, die dann dem Hauptchromatogramm durch Ersparnis von Zeit und Material zugute kommen. Sehr häufig kann man schwach gefärbte Zonen in der Säule von zufälligen Verunreinigungen erkennen, die horizontal sein sollen. Verborgene oder geneigte Zonen deuten auf ungleichmässige Struktur der Säule, die kaum eine saubere Trennung erlaubt. Weitere Erleichterungen sind nach Bedarf automatische Nachfüllvorrichtungen und besonders Fraktionensammler, die selbst mit automatisch registrierenden Spektrophotometern kombiniert werden können, sofern die geeigneten Lösungsmittel angewandt werden, deren Wechsel ebenfalls automatisierbar ist [46]. Zur fraktionierten Sammlung grosser Volumina vgl. [122].

Statt des stufenweisen Wechsels von Lösungsmittelgemischen, ist die Anwendung der sogenannten Methode der gradient elution besonders bei Routinechromatogram-

men mit nur zwei verschiedenen Lösungsmitteln recht vorteilhaft [30]. Mit Hilfe dieser Methode wird das Elutionsmittel kontinuierlich an polarem Lösungsmittel konzentrierter, wobei man die Konzentrationskurve konkav ($R_2 > 2\,R_1$), konvex ($R_2 < 2\,R_1$) oder linear ($R_2 = 2\,R_1$) wählen kann (s. unten). Aus theoretischen Gründen gibt eine nach oben konkave Konzentrationskurve (Konzentration am Anfang klein, dann stark zunehmend) die besten Trennungen und minimale Schwanzbildung (tailing) der Substanzen. In Fig. 1 [30] ist eine von LAKSHMANAN UND LIEBERMAN erfolgreich angewandte Anordnung wiedergegeben, welche mit Benzol und Äthanol arbeitet. (Trennung von 17-Ketosteroiden aus Harn; siehe auch unter speziellen Beispielen.) Der Apparat besteht aus einem Hershberg-Tropftrichter und einer Mischkammer mit magnetischem Rührer. Der Tropftrichter enthält die relativ konzentrierte Stocklösung ($C_0 = 4\%$ Äthanol in Benzol) und die Mischkammer Benzol ($V_0 = 700$ ml). Die Ausflussgeschwindigkeit R_1 aus dem Tropftrichter wird durch die Einstellung des Wolframdrahtes in der Kapillare reguliert, diejenige (R_2) aus der Mischkammer durch den Hahn. Bei P wird überall der gleiche Druck angelegt (Details s. im Original [30], z.B. $R_1 = 0.33$ ml/min, $R_2 = 2.5$ ml/min). Nach der Formel $C = C_0 \left[1 - \left(\frac{a}{a+bt} \right)^{\frac{1}{b}} \right]$, wobei $a = (V_0/R_1)$ und $b = 1 - (R_2/R_1)$ darstellen, lässt sich zu jeder beliebigen Zeit t berechnen, wie stark die Alkoholkonzentration C in der Mischkammer bzw. ihrem Ausfluss ist. Statt der soeben beschriebenen Anordnung lässt sich z.B. auch eine in Fig. 2a wiedergegebene gut verwenden [36]. Sind beide Flaschen nach Form und Inhalt gleich, so ergibt sich, da $R_2 = 2\,R_1$, eine lineare

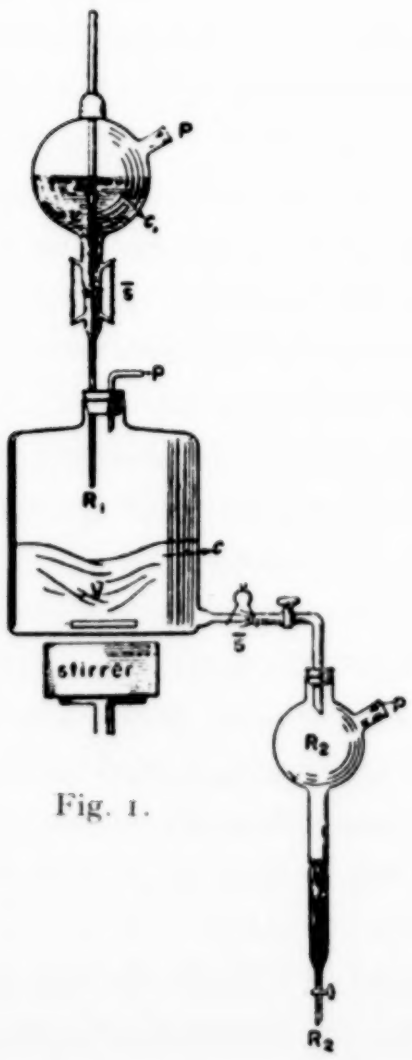


Fig. 1.

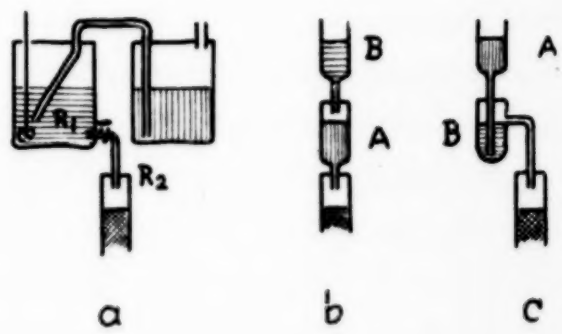


Fig. 2.

Konzentrationskurve. Durch Änderung der Form und damit des Inhaltes einer oder beider Gefässe lassen sich R_2 und R_1 beliebig variieren.

Einfachere Anordnungen erfüllen oft ebenfalls ihren Zweck für kleine Säulen, z.B. diejenige von HEFTMANN UND JOHNSON [47] für die Bestimmung von Corticosteroiden im Urin (s. Fig. 2b), wobei ein schweres Lösungsmittel *B* zu einem leichten *A* getropft wird oder z.B. diejenige von DONALDSON *et al.* [48] für das Zutropfen von leichten (*A*) zu schweren (*B*) Lösungsmitteln (Fig. 2c).

Die einzelnen, nach Entfernung des Lösungsmittels erhaltenen Fraktionen werden getrennt geprüft, z.B. auf Grund von Smp., Kristallform, Farbreaktionen (vgl. Nachweisreaktionen bei der Papierchromatographie, Abschnitt IV 1 e u. f), UV- oder IR-Spektren, Radioaktivität oder sehr vorteilhaft auch auf Grund einer papierchromatographischen Analyse. Fraktionen mit identischen Verbindungen werden dann vereinigt und für die weitere Verarbeitung oder Identifizierung benützt.

Eine andere Variante der Methode der fraktionierten Elution besteht in ihrer Kombination mit der sogenannten Verdrängungschromatographie nach TISELIUS [10], bei welcher man nach Adsorption des Substanzgemisches statt mit reinen Lösungsmitteln oder ihren Gemischen mit einer Lösung eines stärker adsorbierbaren Stoffes eluiert, der die andéren vom Adsorbens sukzessive verdrängt (vgl. z.B. [26]). Diese Methode hat bisher jedoch kaum Eingang in die Steroidchromatographie gefunden und scheint der klassischen Ausführung auf diesem Gebiet unterlegen zu sein.

Die soeben ausführlich beschriebene Methodik der fraktionierten Elution unter Benützung von Aluminiumoxyd ist unter den angegebenen Bedingungen auch für die übrigen gebräuchlichen Adsorbentien wie Magnesiumsilikat, Silicagel etc. anwendbar. Für Kohle ist zu beachten, dass annähernd die umgekehrte Reihenfolge der eluotropen Reihe des Lösungsmittels gilt und dass somit die Adsorption am stärksten ist bei schwach polaren Steroiden aus stark polaren Lösungsmitteln und die Elution am leichtesten von stark polaren Steroiden mit schwach polaren Lösungsmitteln.

7. Beschreibung der Chromatogramme

Die experimentelle Beschreibung einer Chromatographie sollte folgende Angaben enthalten, um Vergleiche oder Reproduktionen zu ermögiichen:

Herkunft, Vorbehandlung und Aktivität oder Wassergehalt des Adsorptionsmittels, Verhältnis von Menge Adsorbens zu Substanz, Säulendimension.

Art der Lösungsmittel für die Bereitung der Säule und für die Chromatographie der Substanz; das Volumen der Eluate, eventuell das Retentionsvolumen der Säule; Filtrationsgeschwindigkeit, Druck; gegebenenfalls Darstellung des Chromatogramms in Tabellen- oder Kurvenform.

8. Spezielle Beispiele

(*a*) *Sterine*

(1) *An Aluminiumoxyd*: Geeignete Elutionsmittel Petroläther–Benzol–Äther.

Literatur S. 252/258.

In Tab. 4 sind einige Beispiele der Trennung von Isomeren zusammengestellt.

Hiervon sei in Tab. 5 ein Beispiel [53] ausführlicher wiedergegeben: 430 mg Gemisch, 20 g Al_2O_3 (Aktiv. III), Fraktionen zu 25 ml:

Über die Trennung von Cholesterin und seinen Estern vgl. z.B. [57]. Bei vielen

TABELLE 4

Isomere in der Reihenfolge der Eluierbarkeit	*Sterische Lage u. Conformation der OH- oder $OCOCH_3$-Gruppen*	*Ringverknüpfung A/B*	*Literatur*
epi-Cholesterin	3*α*(a)		49, 50
Cholesterin	3*β*(e)		
epi-Cholestanol	3*α*(a)	trans	49, 51
Cholestanol	3*β*(e)	trans	
Koprosterin	3*β*(a)	cis	52
epi-Koprosterin	3*α*(e)	cis	
7*α*-Hydroxy-cholesterin-diacetat	3*β*, 7*α*(a)		53
7*β*-Hydroxy-cholesterin-diacetat	3*β*, 7*β*(e)		
3*β*-Acetoxy-7*α*-hydroxy-cholestan	3*β*(e), 7*α*(a)	trans	54
3*β*-Acetoxy-7*β*-hydroxy-cholestan	3*β*(e), 7*β*(e)	trans	
Koprosterin	3*β*(a)	cis	55
Cholestanol(3*β*)	3*β*(e)	trans	55
$\Delta^{3,5}$-Cholestadien-on(7)			56
$\Delta^{4,6}$-Cholestadien-on(3)			

TABELLE 5 [53]

Fraktion	*Lösungsmittel*	*7-Hydroxy-cholesterin-diacetat*
1–6	Benzol	
7–11	Benzol + 5% Äther	
12–13	Äther	
14–25	Äther	7*α*-Isomeres
26–42	Äther	7*β*-Isomeres
43–48	Äther + 2% Methanol	

Sterinen ist darauf zu achten, dass sie recht oxydationsempfindlich sind. Über die Trennung von Calciferol und Precalciferol als Dinitrobenzoate vgl. [58].

(2) *Trennungen an Silicagel oder Kieselsäure*: Cholesterylpalmitat–Stearinsäure–Glyceride (Petroläther–Benzol [59]); Cholestanon–Cholestenon [60]; Sterine als Azoylester an Silicagel–Celite 2:1 [18] oder Kieselsäure–Celite 2:1 [61]; Sterine als *p*-Jodbenzoate mit ^{131}J an Kieselsäure–Celite 2:1 [20, 119, 124].

(3) *Aluminiumsilikat*: Zur Trennung von Sterinen oder ihren Glycosiden direkt aus natürlichen Ölen vgl. [22,23].

(4) *Florisil*: vgl. [184].

(*b*) *Steroide*

(1) *Aluminiumoxyd*. Am häufigsten werden als Elutionsmittel Petroläther–Benzol–

TABELLE 6

Isomere in der Reihenfolge ihrer Eluierbarkeit	*Stereochemie*		*Literatur*
	OH od. OCOR in Stellg. 3	*Ringe A/B*	
Androsteron	α (a)	trans	43, 62
Testanol(3α)-on(17)	α (e)	cis	
Testanol(3β)-on(17)	β (a)	cis	63
Androsteron	α (a)	trans	
Androsteron-acetat oder -benzoat	α (a)	trans	64
Androstanol(3β)-on(17)-acetat oder -benzoat	β (e)	trans	
Testanol(3α)-on(17)-benzoat	α (e)	cis	64
Testanol(3β)-on(17)-benzoat	β (a)	cis	
Androstanol(3β)-on(17)-benzoat	β (e)	trans	64
Testanol(3β)-on(17)-benzoat	β (a)	cis	schwer trennbar
Allopregnanol(3β)-on(20)-benzoat	β (e)	trans	64
Pregnanol(3β)-on(20)-benzoat	β (a)	cis	schwer trennbar
Allopregnanol(3α)-on(20)	α (a)	trans	65
Pregnanol(3α)-on(20)	α (e)	cis	
21-Acetoxy-pregnanol(3β)-dion(11,20)	β (a)	cis	66
21-Acetoxy-pregnanol(3α)-dion(11,20)	α (e)	cis	
Allopregnantetrol(3α,11β,17α,21)-on(20)-diacetat	α (a)	trans	67
Allopregnantetrol(3β,11β,17α,21)-on(20)-diacetat	β (e)	trans	
Androstandion(3,17)	—	trans	65
Testandion(3,17)	—	cis	
Allopregnandion(3,20)	—	trans	65
Pregnandion(3,20)	—	cis	

Äther–Chloroform, ferner Benzol oder Tetrachlorkohlenstoff–Alkohol verwendet.

In Tab. 6 sind Trennungen von Verbindungen wiedergegeben, die sich nur durch Isomerie in 3-Stellung und/oder durch die Verknüpfung von Ring A/B unterscheiden.

Weitere Beispiele von Steroiden mit räumlicher Isomerie der Substituenten am C-Atom 11, 17 und 20 finden sich in Tab. 7. Über die Beziehungen zwischen Konstitution und chromatographischem Verhalten vgl. Abschnitt 10.

Für die Trennung von Naturstoffen geben z.B. VON EUW UND REICHSTEIN [72] ein instruktives Beispiel. Es handelt sich um die Chromatographie von 3.3 g einer vorgereinigten, acetylierten* ketonischen Fraktion schwächer polarer Bestandteil von Rinder-Nebennieren an 90 g Aluminiumoxyd; 400 ml-Fraktionen (Tab. 8).

Weitere Beispiele aus dem gebiet der Nebennieren-Steroide s. z.B. [66, 73, 74].

Aus den umfassenden Arbeiten von DOBRINER *et al.* [43, 63, 65] zur Isolierung von Harnsteroiden sei beispielsweise das Schema einer systematischen fraktionierten

* Es kann vorkommen, dass durch die Acylierung mit einem Säureanhydrid und Pyridin, das noch wenig Schwefel enthält, dieser in das Gemisch gebracht wird. Der Schwefel erscheint dann bei der Chromatographie im Eluat mit Petroläther oder Petroläther–Benzol.

TABELLE 7

Isomere in der Reihenfolge ihrer Eluierbarkeit	*Stereochemie*		*Literatur*
	Substituenten	*Ringe A/B*	
3β,11-Diacetoxy-12-ketoätiansäuremethylester	3β (a), 11α (e)	trans	68
	3β (e), 11β (a)	trans	
Δ⁵-Androstendiol(3β,17)-3-acetate oder -benzoate	3β, 17α	—	64
	3β, 17β	—	
Δ⁴-3-Keto-androstenol(17)-benzoate	17α	—	64
	17β	—	
Androstanole(17)	17α	trans	69
	17β	trans	
Allopregnantriol(3,17,20)-3,20-diacetate	3β (e), 17α, 20β	trans	
	3β (e), 17α, 20α	trans	70
17α-Allopregnan-Isomeres	3β (e), 17β, 20	trans	
Pregnanol(3α)-on(20)	17β (Seitenkette!)	cis	71
17α-Pregnanol(3α)-on(20)	17α (Seitenkette!)	cis	
Δ⁵-Pregnendiol(3β,20)-diacetate oder -benzoate	3β, 20β	—	64
	3β, 20α	—	
Allopregnandiol(3β,20)-diacetate oder -benzoate	3β (e), 20β	trans	64
	3β (e), 20α	trans	
Pregnandiol(3β,20)-dibenzoate	3β (a), 20β	cis	64
	3β (a), 20α	cis	

TABELLE 8 [72]

Frakt.	*Lösungsmittel*	*Eluate*
1	70% Petroläther + 30% Benzol	
2	55% Petroläther + 45% Benzol	Allopregnanol(3β)-on(20)-acetat
3	40% Petroläther + 60% Benzol	
4	25% Petroläther + 75% Benzol	
5–6	Benzol	Progesteron
7	Benzol	
8–10	Benzol	Δ⁴-Androstendion(3,17)
11–13	Benzol	Krist. Smp. 277–278°
14	Benzol	
15–16	99% Benzol + 1% Aether	Krist. Smp. 234–236°
17	98% Benzol + 2% Aether	
18	98% Benzol + 2% Aether	Krist. Smp. 242–245°
19	98% Benzol + 2% Aether	Allopregnandiol(3β,11β)-on(20)-acetat
20	96% Benzol + 4% Aether	
21	94% Benzol + 6% Aether	Adrenosteron
22	92% Benzol + 8% Aether	
23	88% Benzol + 12% Aether	Krist. Smp. 259–261°
24	85% Benzol + 15% Aether	17β-Hydroxyprogesteron
25	80% Benzol + 20% Aether	
26	70% Benzol + 30% Aether	17a-Methyl-D-homo-androsten-(4)-ol(17a)-dion(3,17)
27	50% Benzol + 50% Aether	
28–36	Aether und Aether mit 1–60% Aceton	Diverse hochschmelzende Kristalle

Literatur S. 252/258.

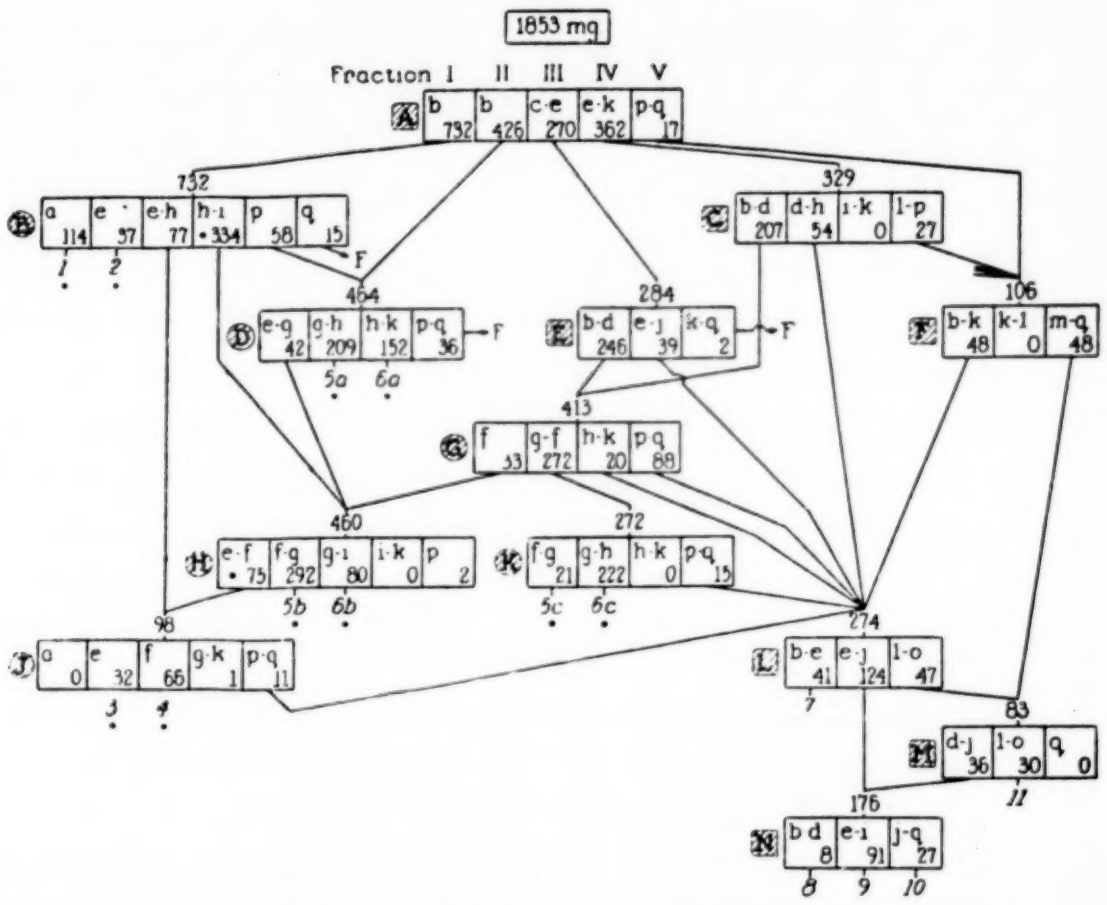


Fig. 3. Schema einer systematischen fraktionierten chromatographischen Trennung von α-ketonischen Steroiden aus Urin [43]. a = Petroläther–Benzol (1:1); b = CCl_4; c = CCl_4–Benzol (1:3); d = CCl_4–Benzol (1:1); e = Benzol; f = Benzol–Aether (9:1); g = Benzol–Aether (8.5:1.5); h = Benzol–Aether (4:1); i = Benzol–Aether (3:1); j = Benzol–Aether (1:1); k = Aether; l = Aether–Methanol (49:1); m = Aether–Methanol (19:1); n = Aether–Methanol (9:1); o = Aether–Methanol (1:1); p = Methanol; q = Essigsäure. Die schraffierten Quadrate bedeuten Magnesiumsilikat als Adsorbens und die schraffierten Kreise Al_2O_3. • = Kristallisierte Fraktionen. Die grossen Buchstaben bezeichnen die einzelnen Chromatogramme. Die Menge Ketosteroide ist in Androsteron-Aequivalenten (Farbreaktion) ausgedrückt.

chromatographischen Trennung von sogenannten α-ketonischen Steroiden wiedergegeben (Fig. 3).

Da einige Verbindungen an Aluminiumoxyd unstabil sind wurde als Ersatz Magnesiumsilikat von vielen geprüften Adsorbentien ausgewählt, welches die beste Ausbeute hinsichtlich Gewicht und chromogenem Wert der Fraktionen ergab. Da die Ausbeute an schwach und mittel polaren Ketosteroiden mit Aluminiumoxyd befriedigend war und Verluste nur bei stärker polaren Fraktionen (nach Testanol(3α)-on(17) eluierbar) auftraten, wurden sowohl Aluminiumoxyd als auch Magnesiumsilikat verwendet. Für die preliminäre Trennung wurde Magnesiumsilikat eingesetzt (Chromatogramm A, Fig. 3), für die weitere Fraktionierung je nach der Polarität der Gruppen Al_2O_3 oder Magnesiumsilikat. Durch Kombination geeigneter Eluate aus verschiedenen Chromatogrammen und durch Rechromatographie wurden sehr komplexe Mischungen in ihre Komponenten zerlegt. Bei strukturell sehr ähnlichen Verbindungen wie $\Delta^{3,5}$-Androstadienon(17) und $\Delta^{2(\text{oder }3)}$-Androstenon(17) oder Androstanol(3β)-on(17) und seinem Δ^5-Analogen wurde eine teilweise Trennung nur nach wiederholter Chromatographie erreicht. Die meisten Substanzen, einschliesslich der Diastereomeren konnten jedoch leicht getrennt werden.

Für die routinemässige qualitative und quantitative Analyse der 17-Ketosteroide

im Urin hat sich die chromatographische Methode ebenfalls ausgezeichnet bewährt. Nach DINGEMANSE *et al.* [31] wird z.B. 1/5 eines 24-Stunden-Harnextraktes (entsprechend *ca.* 6 mg 17-Ketosteroiden) in 50 ml Benzol an 15 g Aluminiumoxyd (equilibriert über 58%iger Schwefelsäure; 2500 fache Menge Aluminiumoxyd bezogen auf Ketosteroide!) adsorbiert und nach folgendem Schema (Tab. 9) eluiert.

TABELLE 9

TRENNUNG VON 17-KETOSTEROIDEN AUS URIN [31]

Fraktionen je 50 ml	*Lösungsmittel*	*Eluierte Steroide (kolorimetriert nach Zimmermann)*
1–3	Benzol	Δ^2-Androstenon(17) Δ^5-3-Chloro-androstenon(17) $\Delta^{3,5}$-Androstadienon(17)
4–5	Benzol	ø
6–8	Benzol	i-Androstanol(6)-on(17)
9–10	Benzol + 0.1% Äthanol	ø
11–13	Benzol + 0.1% Äthanol	Dehydroepiandrosteron Epiandrosteron
14	Benzol + 0.1% Äthanol	ø
15–19	Benzol + 0.1% Äthanol	Androsteron, Δ^9-Androstenol(3α)-on(17)
20–21	Benzol + 0.1% Äthanol	ø
22–30	Benzol + 0.1% Äthanol	Testanol(3α)-on(17) Δ^9-Testenol(3α)-on(17)
31–32	Benzol + 0.1% Äthanol	ø
33–38	Benzol + 0.5% Äthanol	11β-Hydroxy-androsteron + ?
39–40	Benzol + 0.5% Äthanol	ø
41–43	Benzol + 0.5% Äthanol	11β-Hydroxy-testanol(3α)-on(17)
44	Benzol + 2% Äthanol	ø
45–48	Benzol + 2% Äthanol	Diverse Ketosteroide

Durch Auftragung der optischen Dichte der einzelnen Fraktionen gegen Fraktions-Nummern oder gegen das Eluat-Volumen erhält man so bei Einhaltung konstanter Bedingungen sehr gleichmässige und typische Kurvenbilder. Diese Methode ist für klinische Zwecke vielfach angewandt und auch modifiziert worden (vgl. z.B. [40, 41, 42]). Eine sehr elegante Variante haben LAKSHMANAN UND LIEBERMAN [30] unter Verwendung der gradient elution-Technik ausgearbeitet, welche eine komplette 17-Ketosteroidanalyse eines Harnextraktes innerhalb von 5 Stunden erlaubt. Für die

TABELLE 10

TRENNUNG VON 3,5-DINITROBENZOATEN IN GRUPPEN DER MONO-, DI- UND TRIOXYSTEROIDE [76]

	Gruppe	*Elutionsmittel*
I	Cholesterin	Petroläther–Benzol 9:1
II	Allopregnandiol(3α,20α) Pregnandiol(3α,20α) Androstandiol(3α,17β) Δ^5-Androstendiol(3β,17β)	Petroläther–Benzol 1:1
III	Pregnantriol(3α,12α,20) Allopregnantriol(3β,16α,20β)	Petroläther–Benzol 1:4

Literatur S. 252/258.

Bestimmung von Harnsteroiden sind auch ihre 3,5-Dinitrobenzoate herangezogen worden [75, 76], wobei meist nur eine Gruppentrennung in die Ester der Mono-, Di- und Trioxyverbindungen angestrebt wurde. So lassen sich z.B. die Dinitrobenzoate der in Tab. 10 genannten Steroide an Aluminiumoxyd (Aktivität II–III) trennen [76].

(2) *Silicagel.* Die Chromatographie an Silicagel hat in den letzten Jahren an Bedeutung stark zugenommen, vor allem für stärker polare Steroide, deren Chromatographie an Aluminiumoxyd nicht oder nur unter grösseren Verlusten möglich ist. Silicagel eignet sich nicht nur für Gruppentrennungen, sondern selbst für sehr feine Fraktionierungen, sofern die geeigneten Bedingungen gewählt werden. Als Beispiel für die Gruppentrennung von stark polaren Harnsteroiden sei auf Tab. 11 hingewiesen [77], wobei die 30–60fache Menge Silicagel verwendet wurde.

TABELLE 11

VOR-FRAKTIONIERUNG STARK POLARER HARNSTEROIDE AN SILICAGEL [77]

Fraktion	*ml*	*Lösungsmittel*	*Eluat*
1	25–35	Benzol	—
2	50	Benzol–Äther 2:1	—
3	50	Benzol–Äther 1:1	Pregnantriol
4	100	Benzol–Äther 1:2	Pregnantriol
5	50	Äther	Pregnantriol
6	50	Äther–Essigester 9:1	Allopregnantriol(3β,17α,21)-on(20)
	50	Äther–Essigester 4:1	Tetrahydrocortison(3α,5β)
	50	Äther–Essigester 3:1	Cortisol, Cortison
7	50	Äther–Essigester 2:1	Dihydrocortison(5β)
	50	Äther–Essigester 1:1	Pregnantriol(11β,17α,21)-dion(3,20)
	100	Äther–Essigester 1:2	Corticosteron
8	50	Essigester	Tetrahydrocortison(3α,5β)
9	50	Aceton	Cortisol
10	50	Methanol	Cortison, Corticosteron
			Dihydrocortison(5β)

Auch die schwächer polaren 17-Ketosteroide sind an der 200fachen Menge Silicagel mit Petroläther–Benzol–Äther fraktioniert worden [44]; hier scheint Aluminiumoxyd allerdings bessere Resultate zu liefern. Mit entaktivierter Kieselsäure (Wassergehalt 17%) sind aber auch bei 17-Ketosteroiden gute Trennungen erreicht

TABELLE 12

TRENNUNG VON CORTICOSTEROIDEN AN DER 60–100FACHEN MENGE SILICAGEL [78]

Elutionsmittel		*Eluierte Substanzen*
a	*b*	
Benzol–Essigester	Benzol-Äther	
7:1–4:1	4:1–2:1	Progesteron
4:1–3:1	2:1	Pregnenolon
	2:1–1:1	17α-Hydroxyprogesteron
1:1		11β-Hydroxyprogesteron
1:1	Äther–Essigester 4:1	Corticosteron
1:1–1:3	4:1–1:1	Cortisol

Literatur S. 252/258.

worden [120]. Sehr häufig wird Silicagel für die Trennung oder Gruppentrennung von Corticosteroiden aus Blut- oder Organextrakten herangezogen. Vgl. z.B. die Elutionsreihe der Tab. 12 [78].

Über die Trennung von Δ^4-Androstendion(3,17), 6α-,6β- und 19-Hydroxy-Δ^4-androstendion(3,17) mit der gleichen Lösungsmittelreihe vgl. [79]. Zur Gruppentrennung von Corticosteroiden für Mikrobestimmungen mit Chloroform und Chloroform + 0.5–10% Äthanol vgl. [45].

Unter Vermeidung von Essigester oder Alkohol hat sich die Verwendung von Chloroform–Aceton-Mischungen für die Auftrennung der Corticosteroide an der 30–60-fachen Menge Silicagel gut bewährt, Tab. 13a [36]. Hierbei sind mit alkoholarmem Chloroform praktisch noch keine Corticosteroide eluierbar, höchstens etwas Cortexon unter Verwendung von viel Lösungsmittel.

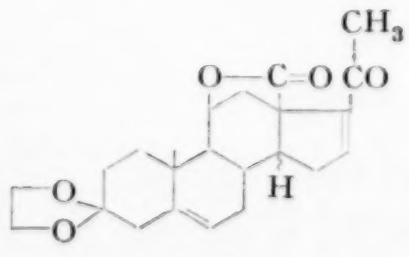
TABELLE 13

TRENNUNG VON REINEN CORTICOSTEROIDEN AN SILICAGEL MIT CHLOROFORM–ACETON-MISCHUNGEN [36]

% *Aceton in Chloroform*	*Eluierte Steroide*
	(a) aktiviertes Silicagel
10–15	17α-Hydroxy-cortexon
10–25	Corticosteron
15–30	Cortison
30–40	Cortisol
	(b) entaktiviertes Silicagel
1–4	11-Dehydro-corticosteron
3–6	17α-Hydroxy-cortexon
6–10	Corticosteron
10–14	Cortison
15–20	Aldosteron
20–35	Cortisol

Mit gewöhnlichem, aktiviertem Silicagel wirkt sich der tailing-Effekt etwas störend auf eine saubere Trennung aus. Wesentlich besser lässt sie sich mit entaktiviertem Silicagel (Wassergehalt z.B. 20%) und der gradient elution-Technik erreichen, s. Tab. 13b. Die Verbindungen sind dann schon mit entsprechend geringerem Acetongehalt eluierbar und die Schwanzbildung lässt sich weitgehend vermeiden [36].

Für eine ausgezeichnete Trennung stereoisomerer Verbindungen ist das in Tab. 14 wiedergegebene Beispiel bemerkenswert [81]. Es handelt sich um die bei der Totalsynthese des Aldosterons anfallenden racemischen Zwischenprodukte VI und VII, die *d,l*-11 → 18-Lactone der $\Delta^{5,16}$-3-Äthylen-dioxy-11β-oxy-20-keto-pregnadien-18-säuren (14α und 14β):



(VI 14α)
(VII 14β)

12 g kritallisiertes Gemisch wurden in Benzol–Essigester (9:1) an 1.2 kg Silicagel (Davison, through 200) in Benzol–Essigester 9:1 adsorbiert; Säulendimension 7.4 × 54 cm; Durchfluss unter Druck: 45 ml/min. Wurde am Anfang die Essigesterkonzentration auch nur auf 8.5:1.5 erhöht, so war keine Trennung mehr möglich!

TABELLE 14

TRENNUNG DER STEREOISOMEREN VERBINDUNGEN VI UND VII AN SILICAGEL [81]

Frakt.	*Vol. (l)*	*Lösungsmittel*	*Eluat (mg)*	
1–11	je 4	Benzol–Essigester 9:1	∅	
12	4	Benzol–Essigester 9:1	3, Oel	
13–14	je 4	Benzol–Essigester 9:1	∅	
15	4	Benzol–Essigester 9:1	287	Kristallisat VI (14α)
16	4	Benzol–Essigester 9:1	574	
17	20	Benzol–Essigester 9:1	4325	
18	20	Benzol–Essigester 9:1	2294	
19	20	Benzol–Essigester 9:1	1146	
20	20	Benzol–Essigester 9:1	570	
21	8	Benzol–Essigester 9:1	103	
22	4	Benzol–Essigester 9:1	35	
23	4	Benzol–Essigester 9:1	28	
24	2	Essigester	120	
25	4	Essigester	804	Kristallisat VII (14β)
26	4	Essigester	362	

(3) *Magnesiumsilikat.* Dieses Adsorbens ist weniger stark und weniger selektiv als Aluminiumoxyd, aber, ähnlich wie Silicagel, sehr nützlich für die Chromatographie stark polarer Verbindungen, die von Aluminiumoxyd nur schwer eluierbar sind. Beispiele hierfür sind bereits bei der Auftrennung von Urinsteroiden [43] angegeben worden (unter Aluminiumoxyd). Vielfach wird es auch für die stark polaren Corticosteroide verwendet, so z.B. für ihre Anreicherung aus Plasmaextrakten mit Chloroform + 2–25% Methanol oder 2–15% Äthanol [34], für die Isolierung von Cortison aus Urin mit Benzol–Äther–Essigester-Mischungen [93] oder von Corticosteroiden aus Nebennieren mit Petroläther–Methylenchlorid–Aceton–Äthanol oder Petroläther–Essigester [46]. Über weitere Beispiele unter Verwendung von Florisil vgl. [185–188].

(4) *Kohle.* Dieses für Steroide wenig gebräuchliche Adsorbens, da nicht ganz harmlos [39], ist entweder zu Reinigungszwecken [25] oder in Mischung mit Celite auch zur Trennung von Isomeren verwendet worden [38]: Kohle–Celite 1:2 in Methanol; Elution von Pregnanderivaten mit Aceton und von Allopregnanderivaten mit Methylenchlorid.

(c) Oestrogene

Für die freien Verbindungen ist bisher die Adsorptionschromatographie an Aluminiumoxyd relativ wenig benützt worden. Über eine grobe Fraktionierung der Harnoestrogene in Oestron, Oestradiol und Oestriolanteile vgl. z.B. [83], über die Trennung der Methyläther von Oestron und Oestradiol an Aluminiumoxyd (Aktivität II) mit

Petroläther–Benzol 6:4 und Benzol vgl. [84]. An Florisil konnten mit Benzol–Aceton und gradient elution feinere Trennungen ausgeführt werden [128].

(d) Glykoside und Aglykone (Cardenolide und Bufadienolide)

Auf diesem Gebiet haben besonders REICHSTEIN und Mitarbeiter zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, wobei hauptsächlich die Reihe Benzol–Chloroform–Methanol mit alkalifreiem Aluminiumoxyd oder Magnesiumsilikat verwendet wurde. Letzteres Adsorbens ist schonender als Aluminiumoxyd, welches aus 16-Acetoxy-Verbindungen leicht Essigsäure abspaltet [85, 86]. Häufig wird hier die Adsorptionschromatographie nur zur Vorreinigung oder Gruppentrennung verwendet mit anschliessender Verteilungschromatographie (siehe dort). Ein Beispiel der Vortrennung von 2.2 g Ätherextrakt aus Strophantus-Samen an 64 g alkalifreiem Aluminiumoxyd ist in Tab. 15 wiedergegeben [87].

TABELLE 15

CHROMATOGRAPHIE VON GLYKOSIDEN AN Al_2O_3 [87]

Fraktionen (je 200 ml)	*Lösungsmittel*	*Menge in mg*	*Eluate, papierchromatographisch geprüft*
1–3	Benzol–Chloroform 8:2	164.9	amorph
4–5	Benzol–Chloroform 6:4	80.0	Glykoside A, B, C
6–10	Benzol–Chloroform 1:3	743.9	A, B, C, D
11–12	Benzol–Chloroform 1:3	27.1	A, B, C, D, F
13–14	Benzol–Chloroform 1:3	3.5	
15–16	Chloroform	12.2	C, D, F
17	Chloroform–Methanol 99:1	308.6	C, D, E, F
18	Chloroform–Methanol 99:1	149.1	D, E, F
19–21	Chloroform–Methanol 99:1	60.4	D, E, F
22	Chloroform–Methanol 99:1	23.0	D, E, F, G
23–25	Chloroform–Methanol 98:2	268.5	F, G
26–28	Chloroform–Methanol 98:2	32.1	G
29–31	Chloroform–Methanol 96:4	32.7	G, (H?)
32–33	Chloroform–Methanol 92:8	12.1	positiv
34	Chloroform–Methanol 85:15		
35	Chloroform–Methanol 70:30	12.1	negativ
36	Chloroform–Methanol 40:60		

C = Vanderosid D = Sarmentocymarin E = Kwangosid F = Emicymarin G = Sarnovid H = Odorosid

Weitere Beispiele unter Verwendung von Aluminiumoxyd oder Magnesiumsilikat-Celite siehe unter anderem [32, 85, 86, 88–92, 94, 95]. Auf ähnliche Weise liessen sich auch Krötengiftstoffe an Aluminiumoxyd vortrennen (Bufotalin, Marinobufagin, Bufotalinin, Telocinobufagin) [96, 97]. Zur Chromatographie an Silicagel vgl. [129].

(e) Sapogenine

Eine Gruppentrennung von Mono- und Dihydroxysapogeninen an Aluminiumoxyd oder Magnesiumsilikat (Florisil) geben WALENS *et al.* an [98]. Von Florisil eluiert man mit

(1) Benzol
(2) Benzol + 5% Chloroform
(3) Benzol + 20% Chloroform
(4) Benzol + 20% Äthanol

Literatur S. 252/258.

In Fraktion (1) und (2) befinden sich die Monohydroxysapogenine (Hecogenin, Diosgenin, Tigogenin, Sarsasapogenin und Similagenin), in den Fraktionen (3) und (4) die Dihydroxysapogenine (Kammogenin, Chlorogenin, Kranogenin, Gitogenin, Markogenin, Samogenin, Yuccagenin, Kryptogenin, Rockogenin). Von Aluminiumoxyd eluiert man mit

(1) Benzol + 5% Chloroform } die Monohydroxysapogenine
und (2) Benzol + 20% Chloroform }
und mit (3) Chloroform } die Dihydroxysapogenine
und (4) Benzol + 20% Äthanol }

Vgl. auch [189].

(f) Gallensäuren

In Form ihrer Methylester eignen sich die Gallensäuren ausgezeichnet für die Chromatographie an Aluminiumoxyd. Als Beispiel sei hier in Tab. 16 die Trennung von Δ^{11}-3α-Acetoxycholensäuremethylester (VIII) und seinem 3β-Isomeren (IX) angeführt [99]. Etwa 300 mg rohes Gemisch wurden an 6.5 g Aluminiumoxyd (standardisiert nach BROCKMANN) in Fraktionen zu 22 ml aufgetrennt.

TABELLE 16

CHROMATOGRAPHIE DER ISOMEREN GALLENSÄUREESTER VIII UND IX AN ALUMINIUMOXYD [99]

Fraktionen	*Lösungsmittel*	*Eluat*
1–3	Petroläther	
4–11	Petroläther–Benzol 9:1	VIII
12–13	Petroläther–Benzol 7:3	VIII
14–15	Petroläther–Benzol 1:1	VIII
16–22	Petroläther–Benzol 1:4	IX
23–24	Benzol	IX
25–28	Benzol–Aether 9:1	IX
29	Benzol–Aether 8:2	Spuren
30	Benzol–Aether 1:1	
31	Aether	
32	Methanol	

In der gleichen Arbeit ist auch die Trennung von 11,12-Dibrom-, 11α,12α-Oxido- und 12-Keto-cholen(9)-säuremethylester beschrieben. Ein weiteres interessantes Beispiel ist die Trennung von Δ^{11}-Cholensäuremethylester, 11-Ketocholansäuremethylester und $\Delta^{9(11)}$-12-Ketocholansäuremethylester mit der gleichen Lösungsmittelreihe wie oben [100]. Zur Trennung von 9,11- und 11,12-Oxidoderivaten des 3α-Acetoxy-cholansäuremethylesters vgl. [101]; Trennung von Gallensäuren als Azoylamide an Aluminiumoxyd [19], oder als Azoylmethylester an Magnesiumcarbonat vgl. [21].

(g) Steroid-Konjugate

Sulfate und Glukuronide von Harn-Steroiden sind kürzlich an Aluminiumoxyd mit Butanol–Wasser [126] oder mit Äthanol–Wasser bzw. Phosphat–Citratpuffer [127] chromatographiert worden.

Literatur S. 252/258.

9. Nebenreaktionen von Steroiden mit dem Adsorbens

Am Anfang dieses Kapitels wurde als eine der Voraussetzungen für eine erfolgreiche Adsorptionschromatographie erwähnt, dass der adsorbierte Stoff durch das Adsorbens nicht verändert werden darf. Dies lässt sich durch die grosse Auswahl von Adsorbentien verschiedener Aktivität praktisch immer erreichen. Immerhin muss hier auf einige Nebenreaktionen von alkalischem Aluminiumoxyd mit gewissen Steroiden hingewiesen werden, welche besondere Vorsichtsmassnahmen erheischen [27].

(1) 17-Hydroxy-20-ketone, besonders solche der 17α-Pregnanreihe können zu D-Homo-ketonen umgelagert werden (Formeln X und XI). Dies lässt sich weitgehend durch Verwendung von alkalifreiem Aluminiumoxyd von niederer Aktivität verhindern und mit den 17-Acetaten (vgl. auch [104]) überhaupt vermeiden.

(2) Δ^5-3-Ketone lagern sich mit alkalischem Aluminiumoxyd in Δ^4-3-Ketone um, nicht aber mit alkalifreiem ([27], Formeln XII und XIII).

(3) Freie Hydroxyketone (α-Ketole, XIV) werden auch an alkalifreiem Aluminiumoxyd teilweise zersetzt; man verwendet daher am besten die entsprechenden Acetate.

(4) 14β,21-Oxido-23 → 21-lactone (XV) aus Cardenoliden (Digitalis, Strophantus) erleiden mit allen Arten von Aluminiumoxyd starke Verluste, vermutlich durch Spaltung des Lactonringes.

(5) Ebenso verhalten sich 20-Keto-21 → 14-lactone der 14β-Reihe (XVI).

(6) Abspaltung von Essigsäure aus gewissen Acetoxyverbindungen, z.B. den Cardenoliden (XVII, XVIII, [86]). Diese Reaktion tritt mit Magnesiumsilikat als Adsorbens nicht ein. Aus 7α-Hydroxy-cortexon-diacetat entsteht leicht die Δ^7-Verbindung [102].

(7) 11,12-Bromhydrine liefern an alkalischem Aluminiumoxyd, nicht aber an neutralem, unter Abspaltung von HBr Epoxyde (XIX, XX [99]).

(8) In Bromverbindungen kann durch mit verdünnter Salzsäure neutral gewaschenem Aluminiumoxyd Brom durch Chlor ersetzt werden (XXI, XXII).

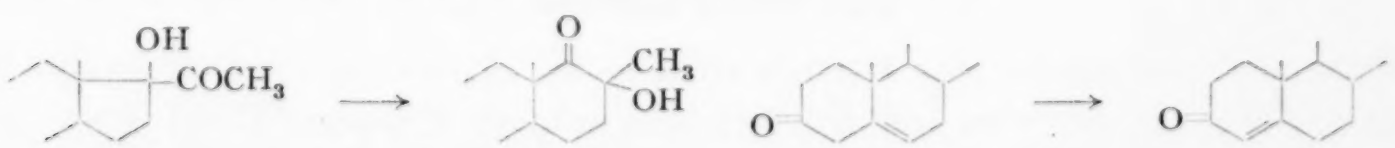
(9) Hydratation von Epoxyden (XXIII, XXIV [107]).

(10) Dehydrierung von Steroid-cyanhydrinen je nach Art des verwendeten Aluminiumoxyds (XXV–XXVII [108]).

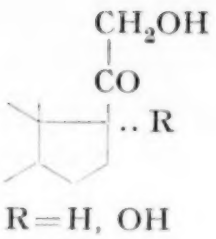
(11) Ersatz von Brom durch OH in Allylstellung (XXVIII, XXIX [109, 110]).

(12) Ferner wurden Verseifung von Steroidbenzoaten [111] und Acetyl-wanderung [112] beobachtet. Cholesterin-ozonid liess sich von Aluminiumoxyd nicht mehr eluieren [113].

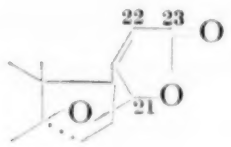
Im allgemeinen sind alle erwähnten Nebenreaktionen umso ausgesprägter je länger sich die Verbindungen im Kontakt mit Aluminiumoxyd befinden. Oft gelingt es, sie durch sehr rasches Arbeiten weitgehend auszuschalten.



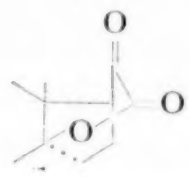
(X) (XI) (XII) (XIII)



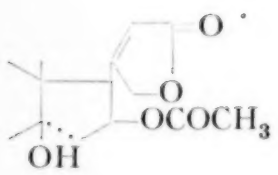
(XIV)



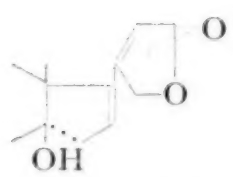
(XV)



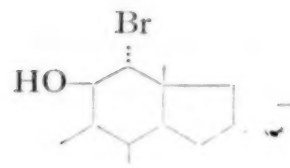
(XVI)



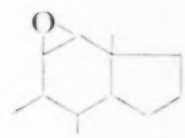
(XVII)



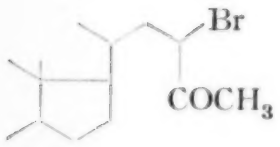
(XVIII)



(XIX)

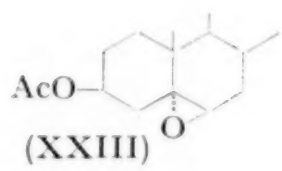


(XX)

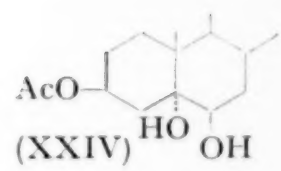


(XXI)

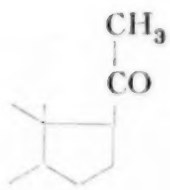
(XXII)



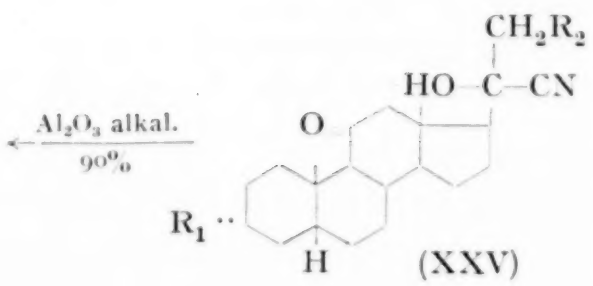
(XXIII)



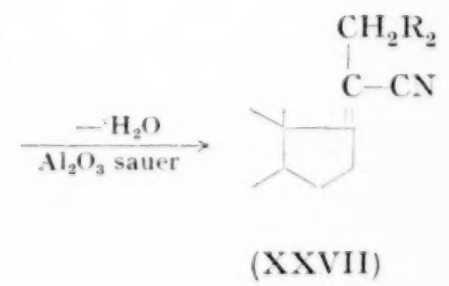
(XXIV)



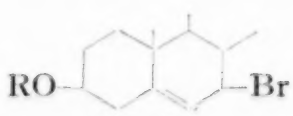
(XXVI)



(XXV)



(XXVII)



(XXVIII)

(XXIX)

Mit schwächer aktiven Adsorbentien wie *Silicagel* oder *Magnesiumsilikat* sind solche Nebenreaktionen kaum festgestellt worden (zur Isomerisierung von Sterinen an Silicagel in halogenhaltigen Lösungsmitteln vgl. jedoch [114]). Kürzlich erst berichteten MATTOX UND MASON [115] über die Zerstörung von α-Ketolen an Silicagel (in Kombination mit Formamid), was jedoch in mehreren anderen Laboratorien nicht der Fall war. Mit völlig wasserfreier Kieselsäure sind gelegentlich Verluste oder Veränderungen der Steroide beobachtet worden [120].

Literatur S. 252/258.

Kohle kann teilweise zur Zersetzung von Steroiden führen, besonders von solchen mit Dioxyaceton-Seitenkette, wobei z.B. aus Cortison Adrenosteron gebildet wird [39]; die verschiedenen Sorten und Bedingungen sind aber noch zu wenig untersucht, um allgemeine Angaben machen zu können.

10. Konstitution und chromatographisches Verhalten (Elutionsreihenfolge)

In Ergänzung zu der bereits in Abschnitt III A 2 erwähnten Reihenfolge von Gruppen mit zunehmender Adsorbierbarkeit bzw. abnehmender Eluierbarkeit können verschiedene Verallgemeinerungen gemacht werden [63, 65], welche in Tab. 17 wiedergegeben sind (vgl. auch bei den speziellen Beispielen, Tab. 4–7).

TABELLE 17

ELUTIONSREIHENFOLGE VON EINANDER ENTSPRECHENDEN STEROID-DERIVATEN [63]

in Aluminiumoxydsäulen

1. Monoketone
2. Monoketone mit 1 Acetoxygruppe
3. Diketone
   (a) Allopregnane
   (b) Pregnane
   (c) Androstane
   (d) Testane
4. Monooxy-monoketone
   (a) Allopregnane
   (b) Pregnane
   (c) Androstane
   (d) Testane

in Magnesiumsilikatsäulen

1. C_{19}-Dihydroxy-monoketone
2. C_{19}-Monohydroxy-diketone
3. C_{21}-Dihydroxy-monoketone

Dazu ist folgendes zu bemerken:

(1) C_{21}-Pregnan-Derivate werden vor den entsprechenden C_{19}-Androstan-Derivaten eluiert.

(2) 3-Hydroxy-Steroide mit Ring A/B *trans*-Verknüpfung (Androstane und Allopregnane) werden vor ihren entsprechenden Isomeren mit Ring A/B *cis*-Verknüpfung (Testane und Pregnane) eluiert, sofern die 3-Hydroxygruppen in vergleichbaren Paaren entweder α- oder β-ständig sind. Ist dies nicht der Fall, wie bei dem Paar Testanol(3β)-on(17) und Androstanol(3α)-on(17) so gilt diese Regel nicht oder nicht immer; hier wird z.B. das Testan- vor dem Androstan-Derivat von Aluminiumoxyd eluiert (vgl. Tab. 4). Dies ist verständlich, wenn das chromatographische Verhalten nicht nur durch die Ringverknüpfung A/B sondern mindestens ebenso durch die sterische Lage der Hydroxylgruppen am C-Atom 3 beeinflusst wird.

(3) Gesättigte Verbindungen werden vor ihren ungesättigten Analogen eluiert,

mit Ausnahme z.B. von Testanolon, welches nach $\Delta^{9(11)}$-Testenolon eluiert wird. Hingegen wird Δ^{1}-Androstendion(3,17) wie erwartet erst nach Androstandion(3,17) eluiert. In der Elutionsreihenfolge kommt das erwähnte Δ^{1}-Androstendion aber vor dem Δ^{4}-Androstendion. Manchmal ist die Trennung von gesättigten und Δ^{5}-ungesättigten Steroiden recht schwierig. RUZICKA UND PRELOG [116] umgingen die Schwierigkeit durch Überführung der Δ^{5}-Verbindung in ein 5α,6α-Diol, das von der unveränderten gesättigten Verbindung leicht abtrennbar war (vgl. auch [64]).

(4) Die Diketomonohydroxyverbindungen werden vor den Dihydroxymonoketonen eluiert mit der bedeutsamen Ausnahme, dass die letzteren mit einer OH-Gruppe am C-Atom 11 vor den ersteren mit einer Ketogruppe am C-Atom 11 eluiert werden. So kommen zuerst 11β-Hydroxy-androsterone und 11β-Hydroxy-testanolon, und erst dann 11-Keto-androsteron und 11-Keto-testanolon.

In groben Zügen gilt die für Aluminiumoxyd gefundene Elutionsreihenfolge auch für andere hydrophile Adsorbentien. Für feiner Unterschiede sind die Regeln jedoch nicht ohne weiteres übertragbar. Tab. 18 gibt darüber Auskunft.

TABELLE 18

Elutionsreihenfolge (→) an	
Aluminiumoxyd	*Magnesiumsilikat*
↓ 11-Keto-androsteron	↑
↓ 11-Keto-testanolon	↑
↓ Androstanol(3β)-on(17)	↑
↓ Δ^{5}-Androstenol(3β)-on(17)	↑
↓ Allopregnandiol(3α,6α)-on(20)	↑
↓ Pregnandiol(3α,6α)-on(20)	↑

Diese Bemerkungen über Konstitution und chromatographisches Verhalten gelten im allgemeinen auch für Acetate oder Benzoate der erwähnten Verbindungen [64].

Epimere Hydroxysteroide ([64, 65, 63], Tab. 4–7).

Von den 3-Hydroxysteroiden werden, sofern sie sich nur durch Isomerie am C-Atom 3 unterscheiden, meist die 3α- vor den 3β-Verbindungen eluiert [51, 64, 67, 117]; Ausnahmen siehe [66, 63, 52]. Von den Hydroxyverbindungen werden stets die 17α- vor den 17β-Isomeren eluiert [64, 69, 70], gleichgültig, ob sich an der anderen Valenz in 17 Wasserstoff oder eine C-Seitenkette befindet. Von den 20-Oxy-Verbindungen werden die 20β- vor den 20α-Isomeren eluiert [64, 70], wobei die Benzoate leichter zu trennen sein sollen, als die Acetate oder die freien Verbindungen [64].

Auf dem Gebiet der Adsorptionschromatographie der Steroide sind noch viele vergleichende Untersuchungen über die Elutionsreihenfolge ausstehend, so dass vorläufig kaum allgemeine Regeln über die gegenseitige Beeinflussung von Isomerien z.B. in 11-und 3- oder 11-und 5-Stellung in bezug auf das chromatographische Verhalten aufgestellt werden können. Im Gegensatz zur Verteilungschromatographie, bei welcher eine gute Übereinstimmung von Wandergeschwindigkeit einer Verbindung

und Konformation (axial oder equatorial) ihrer Hydroxylgruppen besteht, ist dies bei der Adsorptionschromatographie nicht der Fall; bald werden Verbindungen mit axialen, bald mit equatorialen Hydroxylen zuerst eluiert. BARTON (zitiert in [64]) wies darauf hin, dass diese Unregelmässigkeit dem Umstand zugeschrieben werden könnte, dass Verbindungen, die an einer festen Oberfläche adsorbiert sind, möglicherweise andere Konformationen besitzen als in Lösung.

B. VERTEILUNGSCHROMATOGRAPHIE

1. Ausführungsformen

Für die von MARTIN UND SYNGE [12] eingeführte Verteilungschromatographie, die nach den gleichen Prinzipien wie die Gegenstromverteilung nach CRAIG arbeitet, wird prinzipiell die Methode der fraktionierten Elution angewandt, wie sie bereits bei der Adsorptionschromatographie in Abschnitt III A 1 beschrieben wurde. Dort sind auch die Nachweismöglichkeiten der farblosen Steroide im Eluat erwähnt worden. In einem vorhergehenden Abschnitt (II) wurden bereits Vor- und Nachteile von Adsorptions- und Verteilungschromatographie diskutiert und einige Kriterien erwähnt, die für die Auswahl einer der beiden Methoden ausschlaggebend sind. Ohne auf die Theorie der Verteilung einzugehen, sei nur daran erinnert, dass der Verteilungskoeffizient einer Substanz innerhalb eines grösseren Bereiches von der Konzentration unabhängig ist als der Adsorptionskoeffizient. Mit weiter zunehmender Konzentration nimmt aber der Verteilungskoeffizient gewöhnlich ab, was zu einer Ausdehnung der Banden führt. Ähnliche Einschränkungen sind zu machen infolge ungleichförmigen Flusses durch die Säule oder gelegentlicher Verdrängungseffekte. Im übrigen wird man es relativ selten mit einem ganz reinen Verteilungsvorgang zu tun haben; je nach dem angewandten System werden kleinere oder grössere Adsorptionseffekte mit hineinspielen. Dies kann sich störend auswirken, z.B. durch Schwanzbildung der Banden oder aber gerade vorteilhaft, wenn solche Mischformen unter Umständen eine bessere Trennung ermöglichen.

Ein besonderer Vorteil der Verteilungschromatographie besteht darin, dass ihre Lösungsmittelsysteme in weiten Grenzen variiert werden und so den verschiedensten Anforderungen angepasst werden können. Normalerweise arbeitet man mit zwei begrenzt mischbaren Phasen und einem möglichst inerten, hydrophilen Träger, der die relativ stark polare Phase festhält und sie zur stationären macht; die relativ schwach polare Phase läuft dann als mobile Phase von oben nach unten. Für die Ausbildung von stationärer und mobiler Phase ist gelegentlich selbst die Anwendung unbegrenzt mischbarer Lösungsmittel möglich, wenn eines davon vom Träger bevorzugt festgehalten wird. Bei der Gegenstromverteilung wählt man zur Erreichung der besten Effekte die Phasen bei etwa gleichen Volumina so aus, dass der mittlere Verteilungskoeffizient einer Probe nahe bei 1 liegt. Bei der Säulenchromatographie sind nun die relativen Phasenvolumina innerhalb enger Grenzen gegeben, und zwar beträgt das Verhältnis von mobiler zu stationärer Phase nicht 1 sodern meist 5–10.

Literatur S. 252/258.

Die Lösungsmittelsysteme müssen daher so ausgewählt werden, dass der Verteilungskoeffizient $\left[\frac{\text{Konzentration in mobiler (unpolarer) Phase}}{\text{Konzentration in stationärer (polarer) Phase}}\right]$ zwischen 0.2 und 0.1 liegt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, den Träger hydrophob zu machen, worauf das unpolare Lösungsmittel zur stationären und das polare Lösungsmittel zur mobilen Phase wird. Diese auf HOWARD UND MARTIN [130] zurückgehende Methodik der Verteilungschromatographie mit umgekehrten Phasen (reversed phase) ist besonders dann nützlich, wenn kein normales Lösungsmittelsystem gefunden werden kann, das für eine bestimmte Substanz einen Verteilungskoeffizienten von ca. 0.1 ermöglicht.

2. Träger

Als Träger für die stationäre Phase eignen sich neutrale, nicht oder nur schwach adsorbierende, poröse, feinkörnige Materialien. *Kieselgur*, *Silicagel* (Kieselsäure) und *Cellulose* haben sich hierfür besonders bewährt; gelegentlich sind auch verschiedene Silikate (Diatomitstein [329], Florisil [332]) verwendet worden. Diese Stoffe können bis zu etwa 100% ihres Trockengewichtes die stärker polare Phase festhalten. Das freie Volumen der mobilen Phase soll dagegen in der fertig gepackten Säule etwa 250–350 ml pro 100 g Träger inklusive stationäre Phase betragen. Die Partikelgrösse soll zwischen 100 und 300 mesh liegen, um einerseits ein Verstopfen der Säule, anderseits die Ausbildung von Kanälen zu verhindern (vgl. hierzu Abschnitt III A 2 über die Adsorbentien). Bei Phasenumkehr bedient man sich vorteilhaft hydrophobierten Kieselgurs (z.B. mit Dimethyldichlorsilan), gelegentlich auch hydrophobierter oder acetylierter Cellulose oder Gummipulvers.

Kieselgur. Im Handel sind gute Qualitäten verschiedener Korngrösse erhältlich, z.B. Hyflo Supercel, Celite 535 oder 545 (Johns Manville Internat. Corp., New York). Vor Gebrauch wäscht man zur Reinigung z.B. mit konzentrierter Salzsäure, erhitzt 1 Stunde auf 100°, filtriert ab, wäscht mit destilliertem Wasser neutral und ionenfrei und trocknet bei 110° [133, 134]. Nach REICHSTEIN *et al.* [135] wäscht man mit viel heissem destilliertem Wasser bis zur neutralen Reaktion und extrahiert mehrmals der Reihe nach mit heissem Methanol, Benzol und Chloroform bis die Filtrate beim Eindampfen keinen wägbaren Rückstand mehr hinterlassen. Zum Schluss wird nochmals mit Methanol gewaschen und 2 Tage bei 100° getrocknet.

Silicagel, z.B. von Davison Chem. Corp., Baltimore, through 200, No. 923 oder 922, kann durch Waschen mit Äther oder Chloroform [47, 136, 137, 138] gereinigt und nach Trocknen verwendet werden.

Als *Cellulose* verwendet man Handelsprodukte z.B. von Schleicher und Schüll oder Whatman (standard grade oder commercial grade). Baumwoll-linters selbst [131] sind aus mechanischen Gründen weniger geeignet. Besonders bei Cellulose ist gründliches Vorwaschen wichtig, um kleine Blindwerte zu erhalten. Man kocht heiss mit verschiedenen Lösungsmitteln wie Chloroform, Äthanol, Wasser, Aceton und Butanol aus bis die Filtrate keinen Rückstand mehr hinterlassen [139, 140] und trocknet dann im Vakuum.

Literatur S. 252/258.

Gummipulver (z.B. Mealorub von Andresen Corp., Chicago oder von Rubberstichting, Delft) reinigt man durch 24-stündige Extraktion mit Aceton, lässt an der Luft trocknen, verreibt und siebt aus [141].

Hydrophobiertes Kieselgur. Hyflo Supercel wird im Exsiccator den Dämpfen von Dimethyldichlorsilan oder einer niedrig siedenden Mischung von Chlorsilanen ausgesetzt, anschliessend mit Methanol säurefrei gewaschen und bei 100–110° getrocknet [130, 142].

3. Lösungsmittel

Zur Erzielung guter und reproduzierbarer Chromatogramme müssen die Lösungsmittel möglichst rein und nötigenfalls neutral gewaschen sein (s. Abschnitt III A 3). Sie sollen selbstverständlich nicht mit den Substanzen reagieren und relativ leicht flüchtig sein. Sollen die Eluate spektrophotometrisch ausgewertet werden, hat man entsprechend transparente Lösungsmittel auszuwählen. Für präparative Chromatogramme ist es besonders wichtig, dass das Substrat eine hohe absolute Löslichkeit in den beiden Phasen aufweist. Andernfalls lassen sich die Säulen nur wenig beladen oder es tritt leicht Schwanzbildung auf. Lösungsmittelsysteme aus mehr als 2–3 Komponenten sind im allgemeinen sehr temperaturempfindlich. Schliesslich wird die Auswahl der Phasen durch die oben erwähnten Verteilungskoeffizienten bedingt. Für die hier interessierenden Stoffe sind u.a. folgende Lösungsmittel verwendet worden:

(a) stationäre (polare) Phase:

Wasser
Methanol–Wasser 1:1–1:19
Methanol
Aethanol–Wasser 1:3
Aethanol
Aethylenglykol
Propylenglykol
Formamid
Formamid–Wasser 1:1–4:1
Nitromethan
Essigsäure–Wasser 7:3
0.4–3.1 *N*-Natronlauge
0.1 *N*-Natriumacetat
Citratpuffer pH 4.0–4.5

(b) mobile (unpolare) Phase:

Petrolaether
Hexan
Cyclohexan
Isooctan
Benzol
Toluol
Aether
Isopropylaether
Methylenchlorid
Chloroform
Aethylenchlorid
Essigester
Aethanol (nur bis zu 5% in Mischung mit anderen)
Butanol
Amylalkohol
Essigsäure (nur bis zu 5% in Mischung mit anderen)
und Mischungen davon.

Bei Phasenumkehr sind für die beiden Gruppen lediglich die Ausdrücke stationär und mobil auszutauschen. Eine weitere Auswahl kann auch auf Grund der Erfahrungen mit der Craigverteilung sinngemäss getroffen werden. Vgl. hierzu eine Zusammenstellung von über 400 begrenzt mischbaren Lösungsmittelpaaren bei VON METZSCH [143]. Es dürfte sich erübrigen zu betonen, dass beide Phasen stets gegenseitig bei der Arbeitstemperatur gesättigt werden müssen.

4. Apparatives

Für die Verteilungschromatographie eignen sich ohne weiteres Rohre wie sie auch für die Adsorptionschromatographie zur Anwendung gelangen (vgl. hierzu Abschnitt

III A 4). Optimale Länge und Durchmesser der eigentlichen Säule werden durch das gestellte Trennproblem bedingt. Die Länge einer Säule entspricht einer gewissen Anzahl theoretischer Trennstufen, deren Längeneinheit wiederum von Faktoren bestimmt ist, die von Diffusion und Durchflussgeschwindigkeit abhängen. Unterscheiden sich die Komponenten eines Gemisches nur wenig in den Verteilungskoeffizienten, muss die Säule zur Erzielung einer genügend grossen Stufenzahl lang sein und umgekehrt. So entspricht eine 1 m lange Säule hinsichtlich Trennfähigkeit einigen hundert Stufen in der Craig-Verteilung. Der Säulenquerschnitt hingegen bestimmt die Kapazität einer Chromatographie, wobei als Anhaltspunkt diene, dass ein Säulendurchmesser von 2.5 cm für eine Probe von etwa 200–800 mg genügt, ein solcher von 10 cm entsprechend für eine Probe von etwa 3–12 g. Für schwer trennbare Glykosidgemische geben REICHSTEIN *et al.* [135] z.B. folgende Säulendimensionen im Verhältnis zur Substanzmenge an (Tab. 19):

TABELLE 19

DIMENSION VON VERTEILUNGSSÄULEN IM VERHÄLTNIS ZUR SUBSTANZMENGE [135]

No.	*Lichte Weite*	*Nutzbare Rohrlänge*	*Länge der Kieselgursäule*	*Kieselgur–Wasser (1:1)*	*Maximale Substanzmenge**	*Maximale Durchlaufgeschwindigkeit pro Minute**
	mm	*cm*	*cm*	*g*	*g*	*ml*
1	26	61	50	200	0.4	0.07
2	45	90	65	700	1.4	0.3
3	55	120	90	1500	3.0	0.6
4	65	140	115	3000	6.0	1.2

* Bei leicht trennbaren Gemischen (meistens auch bei Mutterlaugen oder Rohextrakten) kann einerseits etwas mehr Substanz aufgegeben, anderseits die Durchlaufgeschwindigkeit erheblich gesteigert werden.

Der Kopf des Rohres ist über einen Glasschliff mit einem als Nachfüllvorrichtung meist kugelförmigen Vorratsgefäss mit Einfüll- und eventuell Druckstutzen verbunden (vgl. z.B. [144]). Bei Anwendung der gradient elution-Technik sind die bereits in Abschnitt III A 6 erwähnten Vorrichtungen (vgl. auch [145] für Mikrosäulen) nützlich. Zum Auffangen der Fraktionen lassen sich selbst komplizierte Trennungen vollständig automatisieren (z.B. "mechanical chemist" [160]). Für die Verteilungschromatographie grösserer Mengen sind auch Anordnungen von 3 Säulen übereinander verwendet worden [146].

5. Bereitung der Säule

(a) Das Verhältnis von Probe zu trockenem Träger variiert bei der Verteilungschromatographie in weiten Grenzen etwa zwischen 1:200 bis 1:10 000. Bei mittelschweren Trennungen wird man meistens mit der 500–1000-fachen Trägermenge auskommen.

(b) Das Verhältnis von Träger zu stationärer Phase schwankt praktisch für alle in Frage kommenden Lösungsmittel im engen Bereich zwischen 1:0.5 bis 1:1, d.h. der Träger wird mit 50–100% seines Gewichtes mit der stationären Phase beladen.

(c) Für die Säulendimension des beladenen Trägers, die sich primär nach dem in Abschnitt III B 4 gesagten zu richten hat, gilt bei richtiger Packung in der Praxis meist ein Verhältnis von Durchmesser zu Länge von 1 : 10 bis 1 : 20, gelegentlich bis 1 : 40.

(d) *Packung der Säule.* Das richtige Einfüllen des mit der stationären Phase beladenen Trägers in das Rohr unter Bildung einer völlig gleichmässigen Säule ist ausschlaggebend für eine gute Trennung. In erster Linie müssen beide Lösungsmittelphasen bei der möglichst konstanten Arbeitstemperatur gut gegenseitig gesättigt (equilibriert) sein. Den Träger beladet man entweder durch Versetzen seiner Suspension in der mobilen Phase mit der gewünschten Menge stationärer Phase unter heftigem Rühren oder man mischt zuerst den reinen Träger gut mit stationärer Phase durch und suspendiert erst dann das immer noch "trocken" erscheinende Gut in der mobilen Phase. In jedem Fall muss man für eine sehr gleichmässige Suspension besorgt sein. Treten Klumpen auf, so ist dies ein Zeichen, dass zuviel stationäre Phase verwendet wurde. In das passende, durch eine Glasfritte, eventuell zusätzlich durch eine Sandschicht abgeschlossene Rohr, das bis zur Hälfte mit mobiler Phase gefüllt ist, giesst man die Suspension ein und öffnet nun ein wenig den Hahn am unteren Rohrende. Die Aufschlämmung lässt man möglichst gleichmässig absitzen unter häufigem Durchmischen und sukzessivem Abpressen mit einer an einem Stab befestigten Siebplatte aus rostfreiem Stahl ("Martin packer"). Sobald sich am Boden der Säule eine feste Schicht gebildet hat, öffnet man den Hahn weiter und presst die restliche Suspension gleichmässig ab, wobei die Masse immer mit mobiler Phase bedeckt sein muss und alle Luftblasen entweichen sollen. Wenn die Säule fertig gepresst ist, lässt man weiter mobile Phase unter Überdruck durchfliessen bis das Material nicht weiter absitzt und eine gleichmässige, dichte Schichte bildet. Die ganze Fülloperation unterstützt man durch Beklopfen der Säule mit einem elastischen Gegenstand. Besonders bei grösseren Säulen ist es oft praktisch, die Füllung portionenweise vorzunehmen, ohne dass man nachher die einzelnen Schichten noch wahrnehmen könnte. Die fertige Säule bedeckt man zum Schutz mit einigen Glaskugeln oder mit Sand und kann sie nun mit einem geeigneten Farbstoff auf Homogenität und Retentionsvolumen prüfen. Man bringt ein kleines Volumen (0.1–1.0 ml) einer konzentrierten Farbstofflösung in der mobilen Phase vorsichtig über den gerade noch mit Lösungsmittel bedeckten Säulenkopf auf und lässt langsam einsickern. Als Farbstoffe sind solche geeignet, die sich praktisch nicht in die stationäre Phase verteilen, z.B. Fettrot, Sudanrot III, etc., die also gleich schnell wie die nun nachgefüllte mobile Phase durch die Säule laufen. Das abtropfende Volumen, das bis zum Erscheinen des Farbstoffes im Eluat gesammelt wird, entspricht dem freien Volumen der mobilen Phase in der Säule (Retentionsvolumen, threshold volume, holdup-volume, dead space, etc.). In gut gepackten Säulen wandert die Farbstoffzone gleichmässig nach unten mit einem symmetrischen Profil längs der Säulenachse, frei von Zungen und anderen Unregelmässigkeiten. Andernfalls kann keine gute Auftrennung erwartet werden, besonders wenn es sich um heikle Trennungen handelt.

(e) Die durch Überdruck regulierbare Durchflussgeschwindigkeit richtet sich nach Säulenquerschnitt und Trennbarkeit und soll für einen Durchmesser von 5–10

mm etwa 0.02–0.2 ml/Minute, für einen solchen von 10–25 mm etwa 0.2–3.0 ml/Minute nicht übersteigen (vgl. auch Tab. 19).

Vor gebrauch der Säule ist es vorteilhaft, sie mit mobiler Phase gut durchzuwaschen bis keine eluierbaren Verunreinigungen mehr nachgewiesen werden können (vgl. [135, 139]).

6. Durchführung der Verteilungschromatographie

(a) Aufbringen der Probe auf die Säule. Im einfachsten Fall löst man das zu trennende Material in einem möglichst kleinen Volumen (0.5–5 ml) der mobilen Phase, bringt diese Lösung auf den Säulenkopf auf wie oben für den Farbstoff beschrieben und lässt mobile Phase nachfliessen. Häufig ist die Löslichkeit in der mobilen Phase zu gering; man kann sich dann so helfen, dass man entweder reinen Träger auf den Säulenkopf schichtet und eine konzentrierte Lösung des Gemisches in wenig stationärer Phase (0.5–1-fache Menge im Verhältnis zur reinen obersten Trägerschichte) gleichmässig aufbringt mit nachfolgender Aufgabe von mobiler Phase; oder man imprägniert eine kleine Menge reinen Trägers zuerst mit der Substanz in einem geeigneten Lösungsmittel, verdampft letzteres im Vakuum möglichst vollständig, vermischt gut mit der 0.5–1-fachen Menge stationärer Phase und presst das ganze Material sorgfältig auf den Säulenkopf, wobei die ganze Prozedur 1–2 mal mit verringerter Trägermenge wiederholt wird, um einen quantitativen Transfer zu gewährleisten (vgl. z.B. [135, 139]). Für das Aufbringen der Substanz können die erwähnten Methoden auf verschiedene Weise variiert werden (z.B. [147]), immer ist aber darauf zu achten, dass das hierzu dienende Lösungsmittelvolumen möglichst klein gehalten werden und das Verhältnis von stationärer Phase zu Träger demjenigen der vorbereiteten Säule entsprechen soll. Gegebenenfalls lassen sich auch mit der Substanz imprägnierte Filterpapierscheiben verwenden.

(b) Das Eluat wird bei entsprechender Durchflussgeschwindigkeit (s. vorhergehender Abschnitt) in Fraktionen geeigneter Grösse (0.1–1000 ml) gesammelt und in der wie bei der Adsorptionschromatographie beschriebenen Weise (III A 6) untersucht, z.B. auf Grund von Gewichtsbestimmungen und Papierchromatographie (s. später). Wiedergewinnungsversuche sind zur Kontrolle einer quantitativen Elution in der Regel angebracht. Bandenprofile getrennter Substanzen sollten möglichst symmetrisch sein mit nur leichter Asymmetrie der Rückseite. Längere Schwänze sind ein Zeichen für schlechtgepackte Säulen, Überladung, Fällung in der Säule, Adsorption, etc. Ist eine Trennung bei einer bestimmten Temperatur unbefriedigend, so kann oft allein die Erhöhung der Temperatur um 5–10° schon ein wesentlich besseres Resultat liefern. Unter Umständen können Verteilungssäulen wiederholt verwendet werden, wenngleich oft die Bereitung einer frischen Säule weniger zeitraubend ist als das völlige Reinwaschen gebrauchter. Bei genau standardisierter Technik ist das Elutionsvolumen für eine bestimmte Substanz konstant und charakteristisch, wie etwa der R_F-Wert im Papierchromatogramm, und zusätzlich gut brauchbar für Identifizierungen.

Literatur S. 252/258.

Die Durchführung von reversed phase Chromatogrammen ist sinngemäss identisch mit der soeben beschriebenen.

7. Beschreibung der Chromatogramme

Um vergleichbare oder reproduzierbare Chromatogramme zu ermöglichen, empfiehlt es sich, folgende Angaben zu machen: Herkunft und Vorbehandlung des Trägers, Verhältnis von Träger zur Substanz, Grad der Behandlung mit stationärer Phase, Säulendimension, Durchflussgeschwindigkeit und Druck; Zusammensetzung der Phasen und Temperatur. Aufbringen der Substanz und Retentionsvolumen der Säule. Fraktionsvolumen. Darstellung des Chromatogramms in Tabellen- oder Kurvenform.

8. Spezielle Beispiele

(*a*) *Sterine*

Zur Trennung eines Gemisches von Luftoxydationsprodukten von Cholesterin benützten MOSBACH *et al.* [148] als stationäre Phase 95%iges wässeriges Methanol oder Propylenglykol an Celite 545 mit Cyclohexan bzw. Petroläther als mobile Phase. In einer 1 × 30 cm Säule (Propylenglykol/Petroläther) erschien bei 0.5 ml Durchfluss/Minute z.B.

Cholesterin von 12.5–26 ml des Eluates,
7-Ketocholesterin von 30–56 ml,
7β-Hydroxycholesterin von 125–195 ml
und 7α-Hydroxycholesterin von 195–225 ml.

(*b*) *Steroide*

Über die verwendeten Lösungsmittelsysteme für die Verteilungschromatographie von verschiedenen Steroiden gibt Tab. 20 einen Überblick, wobei Mengen von wenigen μg bis zu vielen g getrennt wurden. Diese Methode bewährt sich besonders für die relativ empfindlichen Corticosteroide, wenn sie in unveresterter Form chromatographiert werden sollen, obzwar auf diesem Gebiet auch mit der Adsorptionschromatographie durch Anwendung schwacher Adsorbentien gute Erfolge erreicht worden sind. Sehr viele Verteilungschromatogramme leiten sich von der von BUTT, MORRIS UND MORRIS [133] gewählten Technik ab unter Benützung von Kieselgur (Hyflo Supercel, Celite) als Träger, von wässerigem Alkohol als stationäre Phase und von Hexan–Benzol–Chloroform–Essigester als mobile Phase. Systeme mit Wasser, Formamid oder Alkoholen und Glykolen als stationäre Phase an Cellulose, Kieselgur oder Silicagel sind ausgiebig für die Isolierung von Aldosteron verwendet worden. Über eine ausführliche Beschreibung solcher Verteilungssäulen vgl. SIMPSON *et al.* [139]. Propylenglykol scheint sich für Cellulosesäulen weniger gut zu eignen. Die Automatisierung des Trennprozesses ist für Routineuntersuchungen äusserst vorteilhaft [46, 149]. Die schwächer polaren Corticosteroid-acetate und 17-Ketosteroide können ebenfalls gut aufgetrennt werden, obwohl in diesem Fall die Adsorptionschromatographie mindestens ebenbürtig ist, hinsichtlich Ausführung sogar einfacher. Immerhin

können nach der Methode von JONES UND STITCH [138] mit Nitromethan als stationäre Phase eine ganze Reihe von relativ schwach polaren Steroiden aufgetrennt werden. So kann z.B. unter bestimmten Bedingungen der Elutions-Schwerpunkt folgender Verbindungen angegeben werden [138]:

	ml
Δ^4-Cholestenon(3)	24
Δ^5-3β-Chlorandrostenon(17)	33
3,5-Cycloandrostanol(6)-on(17)	90
Androsteron	90
Androstanol(3β)-on(17)	130
Δ^5-Androstenol(3β)-on(17)	170
Testanol(3α)-on(17)	210
Testandiol(3α,11β)-on(17)	210
Δ^4-Androstendion(3,17)	270

wobei sich die einzelnen Banden symmetrisch über 30–40 ml erstrecken. Über die Brauchbarkeit eines Systems entscheidet nicht die gute Trennbarkeit synthetischer Mischungen sondern erst die Anwendung auf natürliche Extrakte, die meist stark verunreinigt sind. So wird es kaum gelingen irgend einen Harn- oder Organextrakt mit einer einmaligen Verteilungschromatographie aufzutrennen. Die besten Möglichkeiten ergeben sich aber durch sukzessives Chromatographieren in verschiedenen Systemen oder auch durch Kombination mit der Adsorptionschromatographie.

Ein Beispiel für die reversed phase Chromatographie bildet die Entfettung von Corticosteroid-Extrakten an Hyflo-Supercel-Silikon-Säulen, in welchen das Fett in der stationären Phase (Petroläther) bleibt während die Corticosteroide mit der mobilen (Äthanol–Wasser 1:1) eluiert werden [151].

(c) *Oestrogene*

Über die bisherigen Versuche zur Verteilungschromatographie von Oestrogenen gibt Tab. 21 Auskunft. Eine zuverlässige und einfache Methode für die Trennung der Oestrogene ist noch ausstehend. Synthetische Mischungen lassen sich zwar trennen, aber aus Extrakten erhält man keine sehr reinen Eluate wie sie für die quantitative Bestimmung benötigt werden. Hier wäre die gradient elution-Technik und Kombination mit Adsorptionschromatographie zweifellos von Nutzen.

(d) *Glykoside und Aglykone*

Diese Stoffklasse stellt ein besonders dankbares Anwendungsgebiet für die Verteilungschromatographie dar. Viele sonst schwer trennbare oder zersetzliche Gemische lassen sich gut auftrennen. Die ersten diesbezüglichen Untersuchungen wurden von STOLL und Mitarbeitern [131] für die Auftrennung herzaktiver Glykoside aus *Scilla maritima* L. unternommen. Unter Verwendung von Cellulose (Baumwollinters) oder Diatomitstein als Träger, Wasser als stationäre Phase und Essigester bzw. Essigester–Butanol (9:1) oder Essigester–Methanol (95:5) als mobile Phase, konnten 8 neue Glykoside isoliert werden. Die Autoren geben eine sehr ausführliche Beschreibung dieser Trennungen. Die gleiche Arbeitsgruppe hat auch mit Erfolg Glykoside und Aglykone der Scilla-, Digitalis-Strophanthus-Gruppe trennen können [129], wobei ein System Silicagel–Wasser–Essigester mit 0.5% Methanol bzw. 2% Methanol in Chloroform ver-

TABELLE 20

VERTEILUNGSCHROMATOGRAPHIE VON STEROIDEN (SÄULE)

Trennung von	*Stationäre Phase*	*Mobile Phase*	*Träger*	*Bemerkungen und Literatur*
Δ^4-Androstendion(3,17) Testosteron Progesteron Cortexon	(7:3) Methanol–Wasser	*n*-Hexan	Hyflo Supercel oder Celite 535	BUTT, MORRIS U. MORRIS [133] TAYLOR [152]
Pregnantriol(3*α*,17*α*,20*α*)	(7.5:2.5)			COX U. MARRIAN [153]
Corticosteroide	Äthanol–Wasser (2.5:7.5)	Toluol	Hyflo Supercel	Trennung unvollständig MORRIS U. WILLIAMS [151, 154]
11-Dehydrocorticosteron + Corticosteron	Äthylenglykol	Toluol–Petroläther (8:2)	Hyflo Supercel	MORRIS U. WILLIAMS [154]
Corticosteroide	Äthylenglykol	Cyclohexan, Cyclohexan–CH_2Cl_2 (10:1, 6:1, 4:1, 3:1, 2:3) und CH_2Cl_2	SiO_2	Vollautomatisch! S und Corticosteron nicht getrennt. HAINES [46, 149]
Corticosteroide insbesondere Aldosteron	Methanol–Wasser (1:1)	Benzol–Petroläther (5:1)	Kieselgur (Celite 545)	SIMPSON U. TAIT [155, 156]
	Methanol–Wasser (1:1)	Benzol–Essigester (10:1) und (5:1)	Kieselgur	
	Wasser	Petroläther–Benzol–Chloroform-Mischungen	Kieselgur	SIMPSON *et al.* [139]
	Methanol–Wasser (3:2)	Toluol–Petroläther (67:33 bis 75:25)	Cellulose	
	Methanol–Wasser (1:1)	Benzol oder Benzol–Essigester (9:1)	Hyflo Supercel	HARMAN *et al.* [147]
Corticosteroide	Wasser	Petroläther–CH_2Cl_2 (gradient elution)	SiO_2	HEFTMANN U. JOHNSON [47, 157]
	Wasser	Benzol–Äther	SiO_2	COOK *et al.* [137]
	Propylenglykol	Toluol	Solka Flok (Cellulose)	BAKER *et al.* [158]
	Propylenglykol	Toluol	Cellulose	Trennung unscharf DIRSCHERL *et al.* [140]
	Formamid	Benzol–$CHCl_3$ (1:1) und $CHCl_3$	Cellulose	MATTOX U. MASON [115]

	Formamid–Wasser (1:1 bzw. 4:1)	Benzol bzw. Benzol–Isooctan (3:2)	Celite 545	Trennung unvollständig BANES [159]
Corticosteroidacetate	Äthanol	Petroläther–CH_2Cl_2 (1:1) + 0–2% Äthanol (gradient)	Florisil	ROSSELET U. LIEBERMAN [132]
	Methanol	Petroläther–CH_2Cl_2 (1:1) + 1% Methanol	Florisil	
	Methanol–Wasser (4:1)	Petroläther–Benzol (3:2 und 2:11)	Celite 545	Trennung Aldosterondiacetat von Cortisonmonoacetat AYRES *et al.* [160]
Corticosteroidacetate, 17-Ketosteroide 20-Ketosteroide	Äthanol	1–2% Äthanol in CH_2Cl_2, oder 1% Äthanol in Petroläther–CH_2Cl_2 (1:1)	SiO_2	KATZENELLENBOGEN *et al.* [161, 162]
	Formamid	Cyclohexan–Benzol (1:1)	SiO_2	
17-Ketosteroide	Nitromethan	3% $CHCl_3$ in Petroläther	SiO_2	JONES U. STITCH [138]

TABELLE 21

VERTEILUNGSCHROMATOGRAPHIE VON OESTROGENEN

Stationäre Phase	*Mobile Phase*	*Träger*	*Bemerkungen*	*Literatur*
2.3 *N*-NaOH	Benzol	Celite 535	nur Trennung von Oestradiol und Oestron; nach Durchleiten von CO_2 kann auch Oestriol eluiert werden	SWYER U. BRAUNSBERG [163] STERN U. SWYER [164] BITMAN U. SYKES [165]
0.4 *N*-NaOH	Benzol	Celite 545	Trennung von Oestradiol, *a*-Dihydroequilin und Dihydroequilenin	HAENNI *et al.* [166]
3.1 *N*-NaOH	Benzol–Petroläther (4:1) und $CHCl_3$–Butanol (17:3)	Celite 535	für die Trennung von Oestron, Oestradiol, Oestriol	BRAUNSBERG *et al.* [144]
Benzol	Methanol–Wasser (2:8) (4:6) (6:4)	Gummi	Oestriol Oestradiol Phasenumkehr! Oestron	NYC *et al.* [141] BOSCH [167]
0.8 *N*-NaOH	Benzol Äthylenchlorid–Benzol (3:1)	Celite 535	Oestron Oestradiol	BAULD [168]
Methanol–Wasser (7:3)	Äthylenchlorid	Celite 535	Oestriol, Trennung von 16-*epi*-Oestriol	BAULD [134] MARRIAN U. BAULD [169]

wendet wurde (Elutionskurven siehe im Original). REICHSTEIN und Mitarbeiter [135] haben dann ein ähnliches System mit Kieselgur–Wasser als stationäre Phase und Benzol, Chloroform, Butanol oder Mischungen davon als mobile Phase ab 1953 mit ausgezeichnetem Erfolg für die Auftrennung der Glykoside aus Strophanthus und anderen Pflanzen verwendet und die Durchführung genau beschrieben. Als Beispiel für die Auftrennung eines sehr komplizierten Gemisches aus den Samen von *Strophanthus vanderigstii* Staner sei auf eine neuere Arbeit dieser Autoren [87] verwiesen, worin zahlreiche Verteilungs- und Adsorptions-Chromatographien kombiniert wurden und zur Isolierung von 8 der 19 nachgewiesenen Raymond-positiven Stoffe in kristallisierter Form führten.

Über die Anwendung von Formamid–Wasser (2:1) an Celite 545 und Benzol–Chloroform (9:1) zum Nachweis von Digitoxin in Tabletten vgl. [170].

(e) *Gallensäuren*

Für die Verteilungschromatographie von Gallensäuren sind seit 1951 besonders von BERGSTRÖM UND SJÖVALL [142, 172, 173] Systeme mit umgekehrten Phasen erfolgreich benützt worden. Als stationäre Phase dient Chloroform–Heptan (9:1) oder ähnliche Mischungen an hydrophobiertem Hyflo Supercel (Dimethyldichlorsilan) und 50–60%igem wässerigem Methanol als mobile Phase. Cholsäure, Desoxycholsäure und Lithocholsäure können gut getrennt werden. Der Einfluss der Änderung von mobiler und stationärer Phase auf das Elutionsvolumen dieser Säuren ist zur Auffindung optimaler Bedingungen genauer untersucht worden. Diese Systeme eignen sich auch für die Trennung anderer Keto- und Hydroxy-cholansäuren [172, 173]. NORMAN [174, 175] hat damit eine Reihe von konjugierten Gallensäuren trennen können. Im Vergleich dazu benützte er ausserdem die gewöhnliche Verteilungschromatographie mit Wasser als stationäre und Amylalkohol–Chloroform (51:9) als mobile Phase. Die Elutionsreihenfolge ist dann genau umgekehrt, doch scheint das Verfahren mit umgekehrten Phasen brauchbarer zu sein. Ein anderes normales System [171] arbeitet mit 70%iger Essigsäure an Celite 545 und Petroläther, Petroläther–Isopropyläther (6:4) und (4:6). Die Reihenfolge der Elution ist Lithocholsäure, Desoxycholsäure, α-Hyodesoxycholsäure, Cholsäure und Dehydrocholsäure.

(f) *Verwandte Verbindungen*

Glucuronide von Urin-Ketosteroiden können nach der Methode von EDWARDS UND KELLIE [136] an Silicagel, das mit 0.1 *N*-Natriumacetat beladen wurde, chromatographiert werden. Beim Eluieren mit Chloroform, das 2% Äthanol und 0.4% Essigsäure enthält, erhält man der Reihe nach die Glucuronide von Androsteron, Testanolon, Testosteron, und bei Erhöhung des Säurezusatzes auf 5%, die 11-hydroxylierten Ketosteroide.

Steroid-Alkaloide (Veratridine, Cevadine) lassen sich gut trennen, wenn Silicagel und Citratpuffer pH 4.25 als stationäre und Chloroform als mobile Phase gewählt werden [176].

Literatur S. 252/258.

9. Schlussbemerkungen

Die Anwendung der Verteilungschromatographie auf das Steroid-Gebiet ist noch sehr ausbaufähig durch die relativ grosse Variationsmöglichkeit der Lösungsmittelsysteme und die Möglichkeit, verschiedenerlei Systeme nacheinander einzusetzen und so den Trenneffekt bedeutend zu verbessern. Nebenreaktionen zwischen Steroid und Trägermaterial wurden bisher kaum beobachtet. Lediglich MATTOX UND MASON [115] berichteten über einen ungünstigen Effekt bei Verwendung von Silicagel und Formamid, was jedoch von anderen Autoren nicht gefunden wurde. Kleine Verluste sind selbstverständlich auch bei der Verteilungschromatographie nie ganz zu vermeiden; sie sollten aber 10% nicht überschreiten.

Über die Zusammenhänge zwischen Konstitution und Wandergeschwindigkeit bzw. Elutionsreihenfolge, lassen sich bei der Verteilungschromatographie viel bessere Angaben machen als bei der Adsorptionschromatographie; die relative Stellung einer Substanz in der Säule hängt im Wesentlichen von ihrem Verteilungskoeffizienten im gegebenen System ab, soferne keine anderen Effekte wie Adsorption, Chelatbildung usw. eine merkliche Rolle spielen. Bei der normalen Verteilungschromatographie wird eine Substanz umso schneller wandern je schwächer polar und umso langsamer je stärker polar sie ist. Bei der reversed phase-Technik trifft gerade das Gegenteil zu.

Für die Diskussion der feineren Unterschiede in der Wandergeschwindigkeit sei hier auf den entsprechenden Abschnitt bei der Papierchromatographie verwiesen, da sich dort bessere Vergleichsmöglichkeiten ergeben. Prinzipielle Unterschiede bestehen jedoch keine.

Literatur S. 252/258.

DESCRIPTION OF A DENSITOMETER FOR DIRECT COLORIMETRY OF IRREGULARLY SHAPED CHROMATOGRAPHIC SPOTS

R. J. WIEME
Laboratory of the Medical Clinic, University of Ghent (Belgium)*

Correct photometry of coloured spots requires a uniform distribution of the absorbing material over the entire slit length. This severely limits the applicability of this otherwise convenient method of quantitative evaluation. In paper electrophoresis the difficulty is overcome by applying the mixture to be analysed along a line at right angles to the direction of the electrophoretic separation. But a regular distribution is not always maintained during the run, so that great colorimetric errors may ensue when direct colorimetry is attempted. This was clearly pointed out by GRASSMANN who also gives a mathematical expression for the error[1]; at higher optical densities this may easily reach 50%.

In paper chromatography it is even more difficult to obtain perfectly shaped spots; round ones are in any case not very suitable for direct colorimetry when a fixed slit length is used.

This error could be minimised by using a very small optical slit so that it can be assumed that the absorbing material is equally distributed over this area. The whole coloured spot could be scanned in this way and the optical densities integrated. Some attempts have been made in this direction but they do not seem to have introduced any improvement[2]. We shall describe here an apparatus, constructed with relatively simple means, which gives satisfactory results with spots of various shapes, and which lends itself to the direct colorimetry of a projected image of electropherograms made on an ultramicro-scale.

MODE OF OPERATION

The coloured material is linearly scanned by a spot of light of 2 × 2 mm, obtained by rotating a slit of 2 mm in front of a slightly curved stationary slit of 25 × 2 mm.

Between the stationary slit and a sensitive photocell, the translucent chromatogram is moved 2 mm at a time. The classical method of scanning in the direction of the run is maintained, but at each step of this "resolving scanning" the coloured material distributed along the stationary slit is scanned by the rotating slit. This "integrating cross-scanning" furnishes a value, read on a galvanometer, that is plotted in the usual manner on linear graph paper as the amount of substance at a

* Director, Prof. P. REGNIERS.

References p. 171.

given distance in the direction of the run. The area under the curve so obtained, is a direct measure of the total amount of substance present in the spot. To make the deflection of the galvanometer directly proportional to the amount of substance distributed along the stationary slit, the logarithm of the amount of light that has been absorbed, has to be integrated and not the amount itself. In histospectrophotometry similar problems arise[3], but the function transformer developed by LOMAKKA[4] cannot be applied here, because of the inertia of this mechanical device. Finally we adapted a photomultiplier circuit, described by SWEET[5] (see also CLINK[6]), which makes use of the exponential relationship that exists, within certain limits, between the sensitivity of a photomultiplier cell and the voltage applied at its dynodes. Conversely, to maintain the output of a photomultiplier cell constant under varying conditions of illumination, the applied voltage must be changed and its magnitude is a direct measure of the logarithm of the amount of light falling in, and thus of the amount of absorbing substance, if the law of Lambert-Beer holds.

In this model the width of the spots that can be read is restricted to 25 mm by the dimensions of the photocathode of the "931 A" cell. Since this was sufficient for our work, we did not attempt to improve upon it, although this must be possible by interposing some optical system between the chromatogram and the photocell. Alternatively, other types of cells with larger photocathodes, could be utilised.

The scanning method lends itself to the direct scanning of the projected image of small electropherograms and coloured tissue preparations. This may be of interest to histochemists. We have used the integrating densitometer for the reading of electropherograms of tissue proteins made on an ultramicro-scale[7].

TECHNICAL DETAILS

I. *Mechanical lay-out* (Figs. 1 and 2)

The black rotating disk is directly fixed on the axis of an induction type motor with shaded pole (electric gramophone motor, ± 2700 r.p.m.). At the circumference of

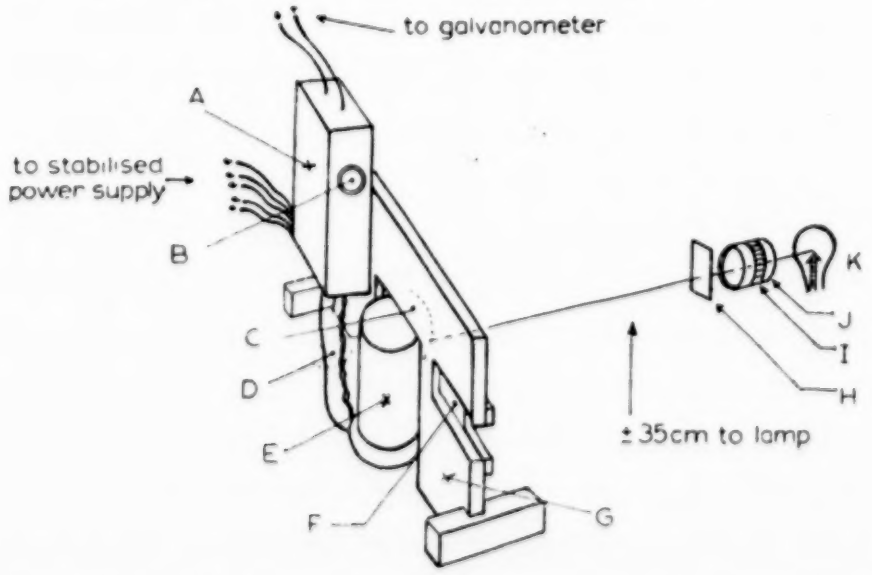


Fig. 1. Mechanical lay-out of the integrating densitometer. A = housing for the 6AG5 tube; B = set zero knob; C = projection of rotating disk; D = connections to photocell; E = photomultiplier housing; F = chromatogram clamped between glass plates; G = wooden frame; H = filter; I = diaphragm; J = objective; K = 6 V lamp.

References p. 171.

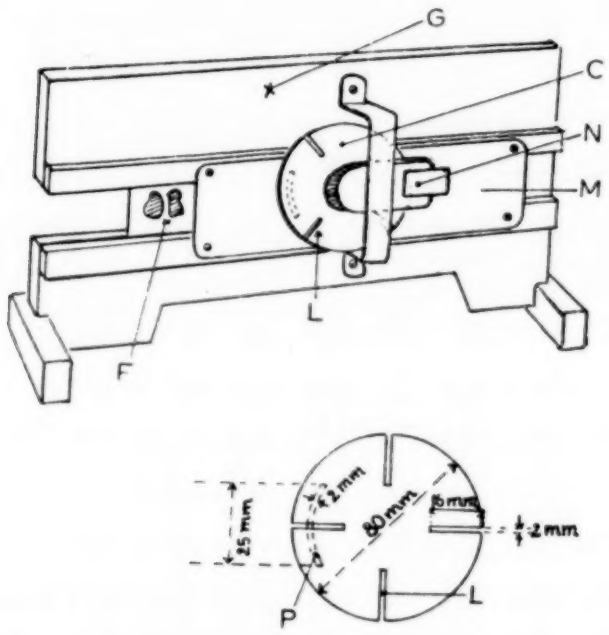


Fig. 2. Mechanical lay-out of the integrating densitometer. C = rotating disk; F = chromatogram; G = wooden frame; L = rotating slit; M = metal plate with stationary slit; N = motor; P = stationary slit.

the disk are situated four equidistant slots of 2 mm width and equal depth so as to maintain perfect wheel balance. At each turn of the disk the stationary slit is scanned four times. In order to obtain an even illumination of the slits we used a good photographic objective (photographic enlarger Meopta, objective Belar, $I = 4.5$, $f = 5.5$ cm) with built-in diaphragm, by means of which the main light level can easily be varied between relatively large limits. The light source, a low voltage tungsten filament lamp (General Electric, 13–23, 6 V, 2 A) fed from a heavy duty storage battery, is placed at the focus of the objective. An interference filter for the desired wavelength, interposed in the lightpath, serves as monochromator. The photomultiplier cell, in its metal housing, is placed as near as possible to the paper to be scanned so that no diffused light is lost. In the housing a rectangular slot of 2.5 × 0.5 cm is cut in front of the photocathode and carefully centered. The unit is countersunk in the wall in order to minimise the amount of direct light falling in. This is important as the direct light may alter the working points of the electronic circuit. With the same aim we interposed a screen (not shown in the figures) between the light source and the rotating slits.

II. *Electronic circuit* (Fig. 3)

The source of high tension is efficiently stabilised and can be set at any value between 400 and 1000 V. This output voltage has to be carefully chosen and fixed. An EF42 pentode was used, but any high slope pentode could be substituted provided the socket isolation is good. The anode of the photomultiplier cell is connected to a + 105 V point via a resistance of $10 \cdot 10^6$ ohms and is also directly attached to the grid of the 6AG5 tube whose cathode is at ground potential. The dark current polarises the grid slightly negative relative to the cathode (— 2 V). When light strikes the photocell this current tends to increase and makes the grid more negative, increasing the internal resistance of the pentode. As a result the voltage applied to the photocell

References p. 171.

is drastically reduced. This voltage change is a logarithmic function of the amount of light falling in. In fact, large voltage pulses of constant frequency and width, but of varying shape, are obtained at the cathode of the photomultiplier tube and it is an easy matter to integrate them by a circuit composed of R and C in series. The integrated voltage is applied to a sensitive galvanometer. Its scale is linearly divided and marked

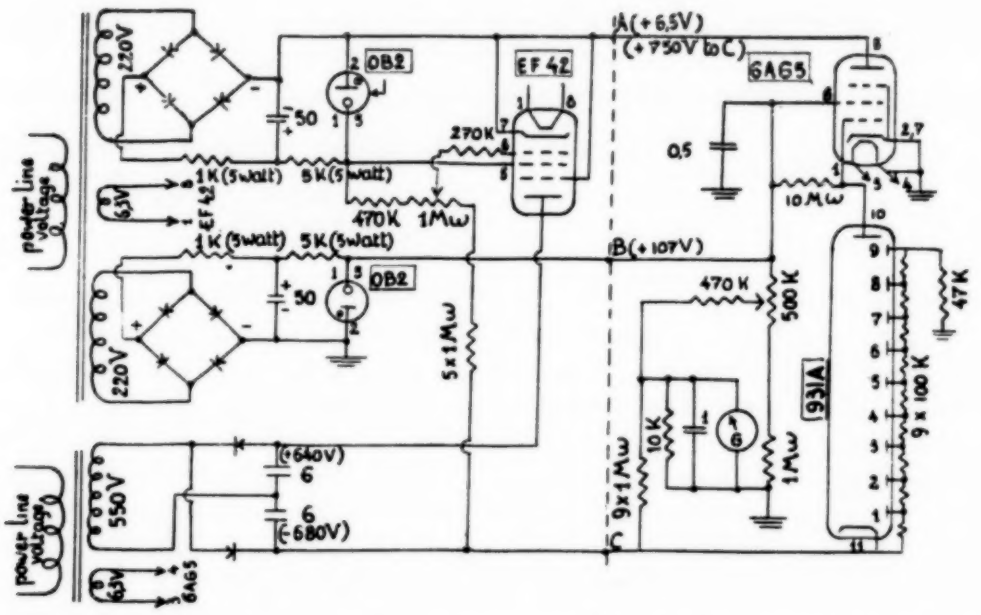


Fig. 3. Electronic circuit of the integrating densitometer. All C values in μF; all resistors of the ½ watt type, unless otherwise specified. All V values measured with vacuum tube voltmeter; input R = 25 Mω. G = galvanometer (Multiflex, Lange, Berlin; sensitivity $4 \cdot 10^{-9}$ A per mm deflection, R = 1300 ω, set to 1/10 of this sensitivity).

from 0–100. By introducing a voltage of opposite polarity, the spot is brought to zero on a blank. When a spot is scanned the integrated voltage changes and the galvanometer index deflects to a value that gives, in arbitrary units, the amount of material present. Stability is high; slight jerks of the galvanometer may be noticed, especially at high optical densities, but these are due to irregularities in the noise voltages and do not interfere seriously with the accuracy of the galvanometer readings. There should be no drift after a warming up period of 15 minutes. When this is not the case the cause should first be sought in an exhausted storage battery.

III. *Final adjustments*

These, although simple, have to be made carefully, as they are essential for a good quantitative response. First of all the stabilised voltage is set at about 720 V. Then the general light level is adjusted so that when a blank is scanned a really high impedance voltmeter reads approximately — 5.5 V at the grid of the pentode. Finally the spot of the galvanometer is brought to zero by the zero-set potentiometer. Then readings can be taken.

IV. *Accuracy*

The accuracy was checked in the following manner:

(1) Equal amounts of a coloured substance applied as spots of various shapes should give equal integrated values with this densitometer. So, 10 or 20 μl of a saturated solution of amido black in methanol containing 10% (v/v) acetic acid, were applied

References p. 171.

as uniformly as possible on dry Whatman No. 1 paper. As extremes spots elongated in the direction of the step by step scanning (3 cm × 1 cm; B spots) were compared against ones that were very short, but extended over the entire slit length (1.5 cm × 2.5 cm; A spots). After oiling the paper, each spot was scanned twenty times. Table I

TABLE I

DIRECT COLORIMETRY OF SPOTS OF VARIOUS SHAPES, CONTAINING EQUAL AMOUNTS OF ABSORBING SUBSTANCE

Amount of amido black, satd. soln. in methanol	*Densitometer*	*A spots**	*B spots**	*Difference*
		mean of 20 readings		
20 μl	Integrating type	1840 units $s = 38$	1837 units $s = 34$	3 $s_{diff} = 11.5$
	Bender and Hobein (slit width reduced to 2.5 cm)	6298 units $s = 95$	5083 units $s = 105$	1215 $s_{diff} = 32$
10 μl	Integrating type	860 units $s = 18$	817 units $s = 19$	11 $s_{diff} = 5.8$
	Bender and Hobein (slit width reduced to 2.5 cm)	3302 units $s = 85$	3199 units $s = 127$	103 $s_{diff} = 34$

* For A and B spots see text.

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma x^2}{n-1}} \; ; \quad s_{diff} = \sqrt{\frac{s_1}{n_1} + \frac{s_2}{n_2}} .$$

shows the results. The standard deviation was of the same order (2%) as the one obtained with a Bender and Hobein densitometer on the same spots. With this latter apparatus, however, a systematic error is introduced especially at higher optical densities and the differences between the means exceed the 5% level of significance. With the densitometer described here, this level is not exceeded so that we may safely assume that spot shape as disturbing factor has been eliminated. It may be of interest to emphasize the fact that with other simple direct colorimeters the systematic error will probably be even greater, as the constructors of the Bender and Hobein photometer have purposely introduced some compensation by increasing the illumination at the center of the optical slit.

TABLE II

PAPER ELECTROPHORESIS OF A HUMAN SERUM (ROUND SPOTS)

Densitometer	*Albumin*	α_1	α_2	β	γ *globulin*
Integrating type	51.8% $s = 1.37$	4.5% $s = 0.45$	14.0% $s = 0.62$	13.1% $s = 0.63$	16.4% (mean of 10 scannings) $s = 0.75$
Bender and Hobein (slit width reduced to 2.5 cm)	40.9% $s = 0.33$	7.5% $s = 0.36$	13.7% $s = 0.39$	12.7% $s = 0.56$	25.0% (mean of 10 scannings) $s = 0.41$
Elution	51.1%	6.9%	11.3%	10.6%	19.9% (mean of 2 readings)

References p. 171.

(2) Electropherograms obtained by applying human serum as a small round spot, were read with the two types of densitometers and compared against the values obtained by elution of the cut-out fractions followed by ordinary colorimetry (staining with amido black, colorimetry at 578 mμ). Table II shows clearly that, with the Bender and Hobein apparatus, too low a value is obtained for the albumin fraction, which is in fact the fraction present in the highest concentration. On the other hand, the performance of the integrating densitometer compares favourably with that of the elution technique. The minor variations in the globulin fractions are probably due to the incertainty in the choice of the cutting lines.

SUMMARY

A uniform distribution of the absorbing material over the entire optical slit is essential for photometry of coloured spots. Irregularly distributed substances could, nevertheless, be measured correctly by using a very small slit, which is moved over the entire spot area, and integrating the total amount of absorbing material. A scanning densitometer fulfilling these requirements, is described. Data are presented demonstrating a good performance in the case of irregularly shaped spots and of actual electropherograms with irregular lateral distribution. With this apparatus it is possible to scan the magnified image of a coloured preparation, so that its application in histochemistry is suggested. The author uses the scanning densitometer in the quantitative estimation of electropherograms made on an ultramicro-scale in agar gel.

REFERENCES

1 W. GRASSMANN AND K. HANNIG, *Z. physiol. Chem.*, 290 (1952) 1.
2 E. DURRUM, *Paper Electrophoresis*, A Ciba Foundation Symposium, Churchill Ltd., London, 1956, p. 148.
3 T. CASPERSSON, F. JACOBSSON AND G. LOMAKKA, *Exptl. Cell Research*, 2 (1951) 301.
4 G. LOMAKKA, *Exptl. Cell Research*, 9 (1955) 434.
5 M H. SWEET, *Electronics*, (1946) 105.
6 L. CLINK, *Electronics*, (1954) 196.
7 R. J. WIEME AND M. RABAEY, *Naturwiss.*, 44 (1957) 112.

Received November 13th, 1957

PAPER CHROMATOGRAPHY OF INORGANIC IONS

XVII. THE PAPER CHROMATOGRAPHY OF Pa(V)*

M. LEDERER

Laboratoire Curie, Institut du Radium, Paris (France)

DISCUSSION

In several papers of this series[1] we have been able to show that the data obtained in paper chromatography, apart from their analytical value, may be used to explain the complex chemistry of the elements chromatographed in the same manner as solvent extraction or ion exchange equilibrium results.

The paper chromatography of Pa has so far been mentioned in only two problems, the separation of UX_1 and UZ[2], and the separation of ^{233}Pa from Nb[3]. In both separations solvents containing HF were employed. In this paper we shall discuss the behaviour of Pa in mixtures of acetone–HCl–water.

This study was commenced with the aim of increasing the amount of data on the paper chromatography of tetravalent cations. As only very few solvents had been studied for tetravalent U and no separation noted between U(IV) and Th(IV), we first looked for a solvent that gave a good R_F difference for the mixture U(IV)–Th(IV). Acetone containing 5% water and 5% conc. HCl gave a good separation in these preliminary tests, while other solvents such as acetone–H_2SO_4, butanol–HCl, butanol–HBr (for the last two see[1]), did not yield notable R_F differences.

The solutions of U(IV) in this work were prepared by shaking a solution of uranyl chloride in the required concentration of HCl with a few ml of zinc amalgam in a micro separation funnel and pipetting off an aliquot just before placing it on the paper. Since Pa lies between U and Th in the periodic table, we thought that it might be possible to obtain a reduction (at least partially) of the Pa(V) if it were added to the zinc amalgam reduction with the uranyl chloride; the reduced U(IV) might exert a protective influence on the Pa(IV) during manipulation. Later experiments proved that this was not the case; however, the first chromatograms showed that there was a distinct difference between the movement of ^{233}Pa tracer shaken with U and zinc amalgam and the pure ^{233}Pa tracer.

Oxidation of the U(IV) with dichromate, ferric chloride, and other oxidants, had a profound influence on the movement of the Pa in these solutions, and since

* Paper presented at the XVIth International Congress of Pure and Applied Chemistry, Paris, July 1957.

References p. 178.

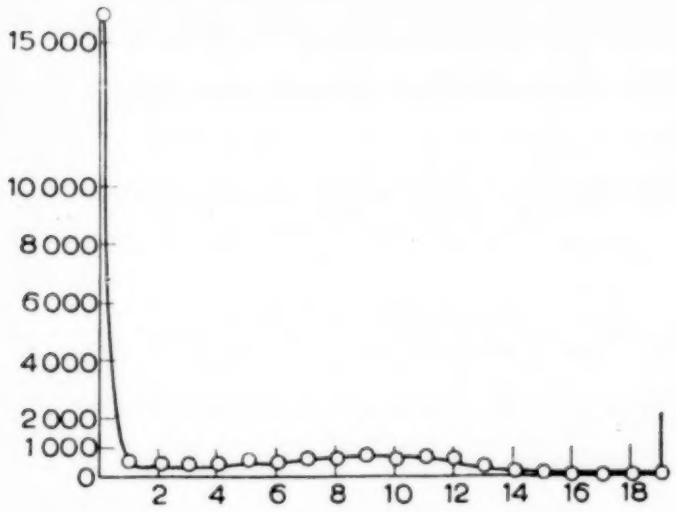


Fig. 1. ^{233}Pa tracer dissolved in 6 *N* HCl and developed with acetone–HCl–water (90:6:4).

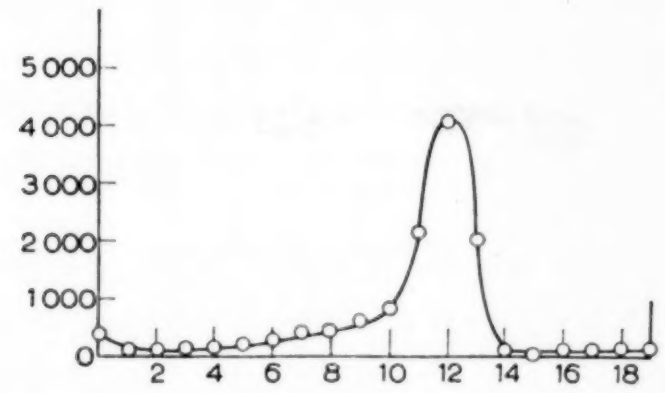


Fig. 2. ^{233}Pa tracer mixed with uranyl chloride in 6 *N* HCl and shaken with Zn/Hg. Mixture developed with same solvent as in Fig. 1.

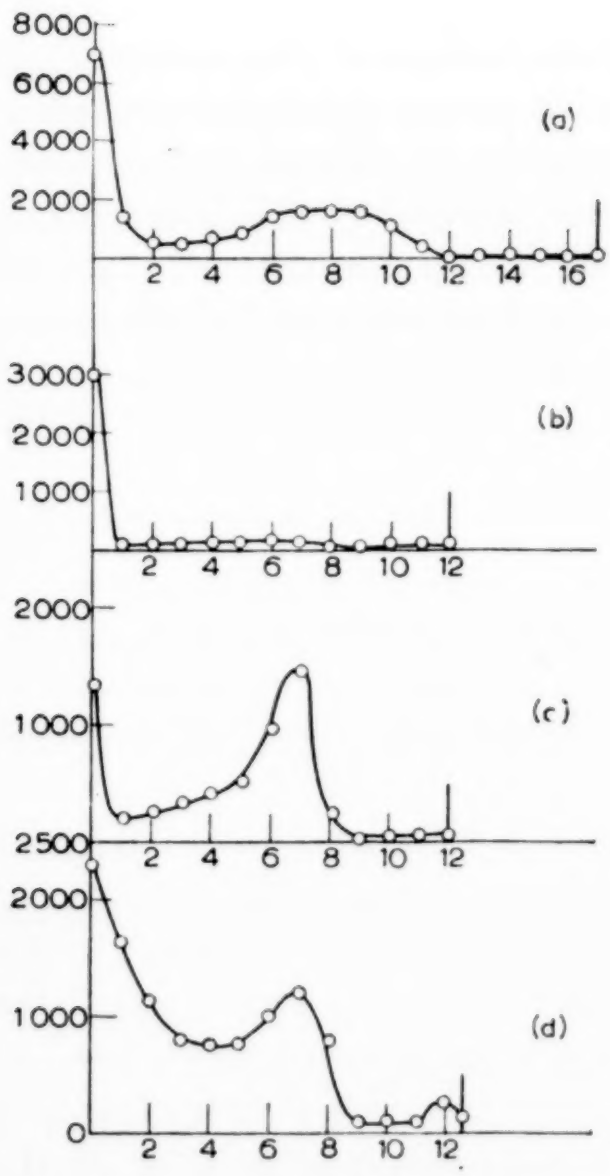


Fig. 3. (a) Solution of Fig. 2, with excess $KMnO_4$ added and developed with same solvent. (b) Solution of Fig. 2, with excess $K_2Cr_2O_7$ and developed as before. (c) Solution of Fig. 2, with excess $FeCl_3$ and developed as before. (d) Solution of Fig. 2, with excess $KClO_3$ and developed as before.

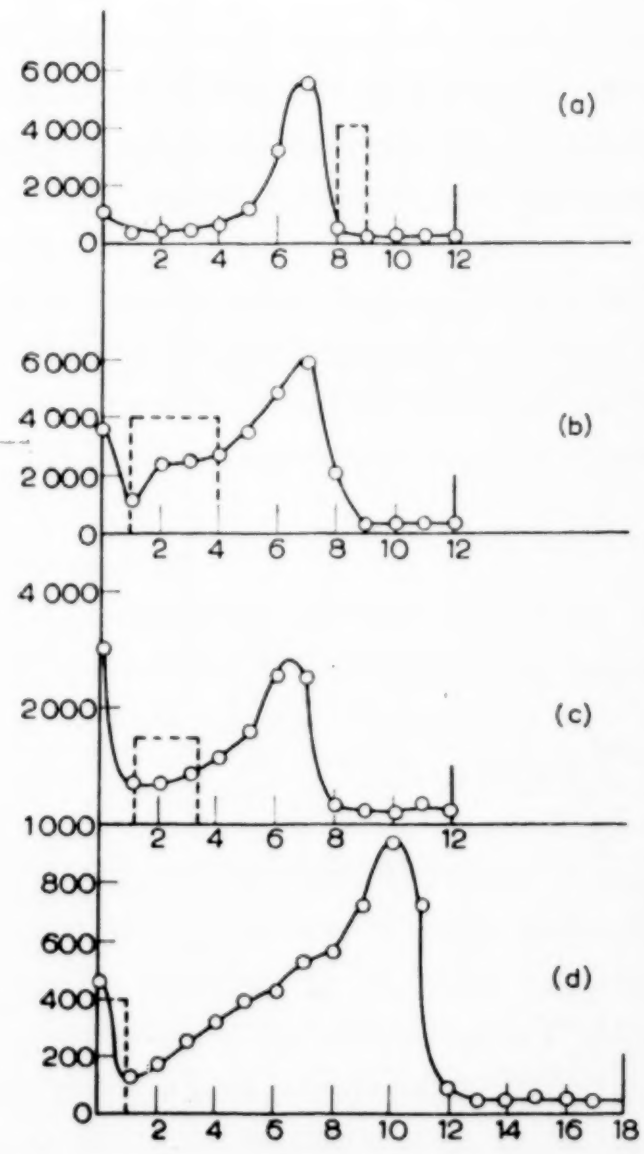


Fig. 4. (a) Solution of ^{233}Pa tracer as used in Fig. 1, mixed with an aerated solution of UCl_4 in 6 *N* HCl and chromatographed with acetone–HCl–water (90:6:4). (b) As in (a), with $ZrCl_4$ solution instead of UCl_4 solution. (c) *Idem*, with VCl_4 solution instead of UCl_4. (d) *Idem*, with $ThCl_4$ solution instead of UCl_4.

References p. 178.

the position of the Pa was between Th and U(IV), the presence of Pa(IV) was at least considered a possibility. Further experiments showed that simple mixing of U(IV) with the Pa tracer or mixing with other tetravalent ions such as V(IV) or Zr(IV) had the same effect on the behaviour of Pa on the paper. Hence, the effect of mixing with U(IV) solutions or tetravalent ions in general seems to be one of desorption from the paper.

Numerous ions were then examined in mixtures of acetone with increasing concentrations of HCl and corresponding decrease of H_2O concentration. The R_M–pCl relationship is a straight line for all ions tested. While the slope of the line must necessarily be in relation to the number of Cl groups in the metal-chloride complex we have not enough results to identify the species of the complexes formed. However, the graph of R_M plotted against pCl permits the calculation of the optimum separation for a given mixture.

EXPERIMENTAL

The ascending method of development was used throughout this work with large jars covered with watchglasses. Since in mixtures of acetone and HCl the temperature and probably the equilibrium of the atmosphere (which depends on the temperature) change somewhat from day to day, all experiments comparing various concentrations of HCl were performed in series that were started simultaneously.

The solutions that were placed on the paper were prepared by dissolving the chloride of the element (usually 2 g/100 ml) in 6*N* HCl. Spots of about 5 μl were placed on the paper (Whatman No. 1) and developed after standing for a few minutes; this did not allow complete drying of the spots.

I. The behaviour of ^{233}Pa tracer

Fig. 1 shows the activity distribution when a solution of ^{233}Pa tracer in 3*N* HCl is developed with acetone–HCl–water (90:5:5). Of the total of about 20,000 counts/15 sec, about 10% move with the solvent in an ill-defined trail, while 90% remain at the point of application.

Fig. 2 shows an aliquot of the same solution of ^{233}Pa, which was mixed with a solution of uranyl chloride and shaken for a few minutes with Zn/Hg. It is interesting to note that there is still not a symmetrical elution curve but a distinct backward trail to the point of application. When this solution is reoxidised with $KMnO_4$, $K_2Cr_2O_7$, $FeCl_3$, or $KClO_3$, the elution of the Pa tracer again resembles that of the original solution as shown in Fig. 3 (a–d). However reversion of properties seem to be due rather to a strong adsorption as soon as oxidation removes tetravalent ions from the solution than to a reduction to a lower valency of Pa. This could be demonstrated by chromatographing the Pa tracer in mixtures with various tetravalent ions as shown in Fig. 4. Here the U(IV) solution had been well aerated and should have been at a potential well above that necessary for reducing Pa(V). The somewhat lower desorbing ability of Th(IV), Zr(IV) and V(IV) is probably due to the fact that the differences between their R_F values and the R_F value of Pa are greater, and thus

References p. 178.

they do not move together with Pa throughout most of the development, as is the case with U(IV).

II. Measurement of R_F values of tetravalent ions with increasing concentration of HCl

The series of solvents studied was acetone containing 10% of aqueous HCl of increasing acidity. Fig. 5 shows the movement of Pa when mixed with U(IV), in solvents ranging from 2.5 *N* to 12 *N* HCl. Tables I and II show the R_F values of Pa and numerous other cations.

R_F values were measured with reference to the *water front*. Zr(IV) behaves differently according to its origin. Solutions of $ZrOCl_2$ (pure, Merck) dissolved in cold 6 *N* HCl gave round spots with a slightly diffused rear edge. Samples of ZrO_2 and $ZrCl_4$ (which were found in our laboratory) when dissolved in HCl either hot or cold yielded usually one spot at the point of origin joined with a spot of the usual R_F value by a more or less pronounced comet. This may offer a method for detection of the formation of colloidal ions in solutions of Zr(IV).

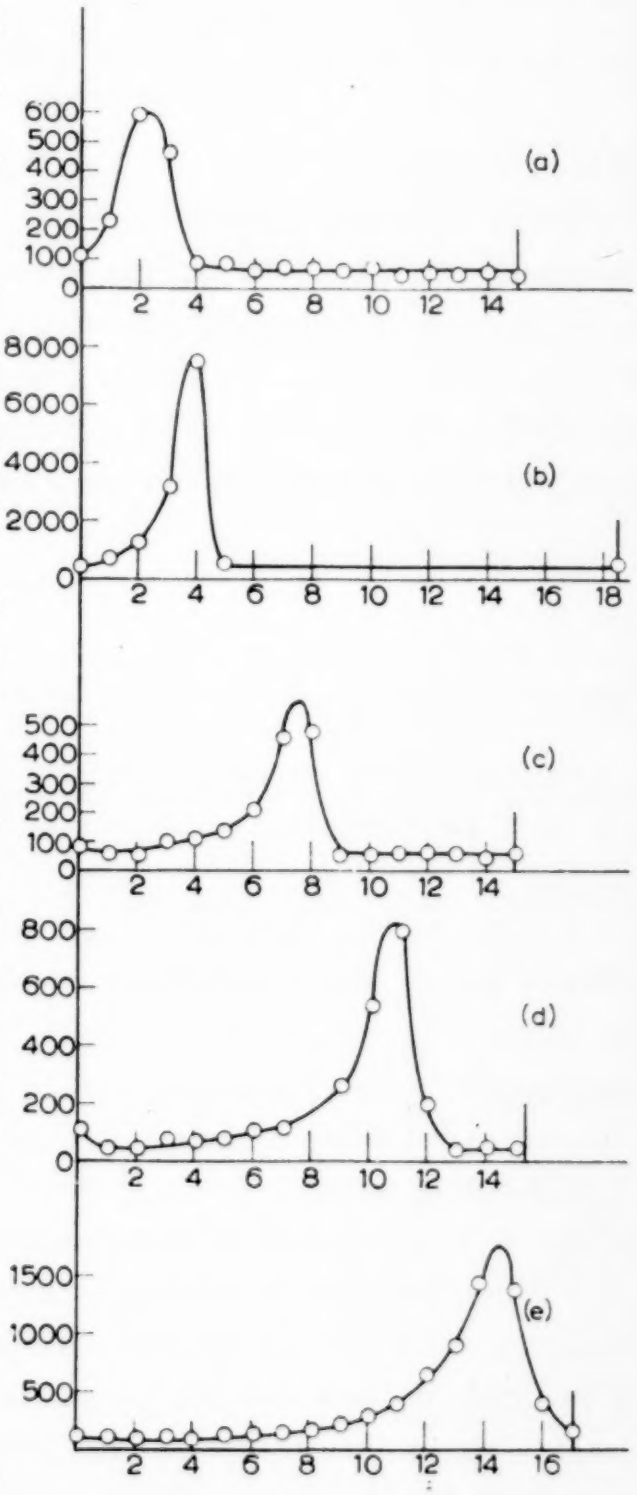


Fig. 5. Mixtures of UCl_4 and ^{233}Pa tracer developed with various mixtures of acetone, HCl and water. The activity curve represents only the ^{233}Pa.

	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
Acetone	90	90	90	90	90
HCl conc.	3.5	5	6	8	10
Water	6.5	5	4	2	—

III. Interpretation of results

The formation of a chloride complex of a metal ion

$$M(H_2O)_x^{y+} + xCl^- \rightleftharpoons MCl_x^{(y-x)+} + xH_2O \qquad (1)$$

when reversible will give the mass action equation

$$K = \frac{[MCl_x] \cdot [H_2O]^x}{[M(H_2O)_x] \cdot [Cl^-]^x} \qquad (2)$$

In those cases where the complex is a cation of diminished charge, a neutral substance, or a weak acid (examples of each type are $FeCl^{++}$, $FeCl_3$, and $HFeCl_4$), it may be assumed that the partition coefficient of the complex favours the organic phase, while that of the free ion usually favours the aqueous phase.

Thus the partition coefficient of a metal ion in equilibrium with its chloride complex will in such cases vary directly with the amount of complexation. If we then express eqn. (2) in the form:

$$-pK = \log \left[\frac{MCl_x}{M(H_2O)_x} \right] + x \log [H_2O] + pCl^- \qquad (3)$$

References p. 178.

we see that the log $\left[\frac{MCl_x}{M(H_2O)_x}\right]$, which is then the log of the partition coefficient will vary as the pCl^- and the log $[H_2O]$. In most chromatographic solvents these two variables vary simultaneously and independently: when, for example, butanol is saturated with HCl of various concentrations it will also dissolve more water, as is usually evident from the amounts of the two phases obtained. In the mixtures of acetone–HCl–water examined, the water concentration is varying inversely with the HCl concentration of the solvent; thus the effect of progressive dehydration and complexation proceed to the same extent and we may rewrite eqn. (3).

$$-pK = \log \left[\frac{MCl_x}{M(H_2O)_x}\right] + 2x\ pCl^- \qquad (4)$$

Thus, when in eqn. (1) the value for x is constant for a given range of HCl concentration then log $\left[\frac{MCl_x}{M(H_2O)_x}\right]$ will vary directly with pCl. The only measure of the log of the partition coefficient that can be obtained from the R_F value is the R_M value ($R_M = \log\left(\frac{1}{R_F} - 1\right)$), whcih as we have shown for similar systems varies directly with log $\left[\frac{MCl_x}{M(H_2O)_x}\right]$ (see eqn. (4)).

We may write $$-pK = R_M + 2x\ pCl^- + K \qquad (5)$$

where K is a constant of the chromatographic system.

When the results of Tables I and II are used to plot R_M against pCl, straight lines are obtained for all cases where the order of accuracy of the R_F measurement is sufficiently high, *i.e.* except for the very high and very low R_F values. Figs. 6 and 7 show this relationship for the tetravalent and for some other cations. Here we see that Mn^{++}, Co^{++}, U(IV), Pa(V) and Zr(IV) vary with the same slope, *i.e.* with the same number for x in eqn. (4) while V(IV) has x one third as great as these other ions. Then there are some ions, such as Ti(IV), Be^{++} and Th(IV), where the

TABLE I

R_F VALUES OF Pa(V) AND TETRAVALENT CATIONS

Solvent			*Pa(V)*	*U(IV)*	*Th(IV)*	*Zr(IV)*	*Ti(IV)*	*V(IV)*
Acetone	*HCl*	*Water*						
90	2.5	7.5	0	0.05	0.012			
90	3.5	6.5	0.17	0.23	0.013			
90	5.0	5.0	0.31	0.52	0.018	0.10	0.095	0.165
90	6.0	4.0	0.49	0.58	0.017	0.28	0.11	0.19
90	7.0	3.0				0.43	0.10	0.224
90	8.0	2.0	0.68	0.80	0.028	0.55	0.12	0.27
90	9.0	1.0		0.86		0.61	0.12	0.29
90	10.0	0	0.84	0.98	0.053			

References p. 178.

TABLE II

R_F VALUES OF VARIOUS ELEMENTS

Solvent			Ni^{++}	Mn^{++}	Co^{++}	Cu^{++}	Be^{++}	Sr^{++}	Ba^{++}	Al^{+++}	Mo^{VI}	SeO_3^{--}	TeO_3^{--}	UO_2^{++}
Acetone	HCl	Water												
90	3	7			0.47	0.89								1.0
90	4	6	0.029	0.33	0.62	0.93	0.27	0	0		WF-LF	LF	WF	1.0
90	5	5								0.019				
90	6	4	0.034	0.52	0.78		0.28	0	0	0.031	WF-FL	LF	WF	
90	7	3				0.97				0.035				1.0
90	8	2	0.02	0.71	0.90	WF	0.26	0	0	0.026	WF-LF	LF	WF	
90	9	1								0.036				
90	10	0	0.02	0.78	0.98	WF	0.21	0	0		WF-LF	LF	WF	

WF = moves on the water front.
LF = moves on the liquid front.
WF-LF = moves between water and liquid front.

slope is slightly positive or negative depending on the exact conditions of the development. It appears certain that no change in complexation occurs with these ions.

We believe that this is the first paper chromatographic system in which a correlation between R_F value and the composition of the solvent has been found for inorganic ions. This correlation should yield information as to the formula of the complex. However, there are still too many unknown factors, such as the state of the ion at the beginning of the straight-line relationship, for one to be able to study complexes by chromatographic methods. From equation (5) it also appears possible to obtain a measure of the instability constant of a complex; however, this would only be

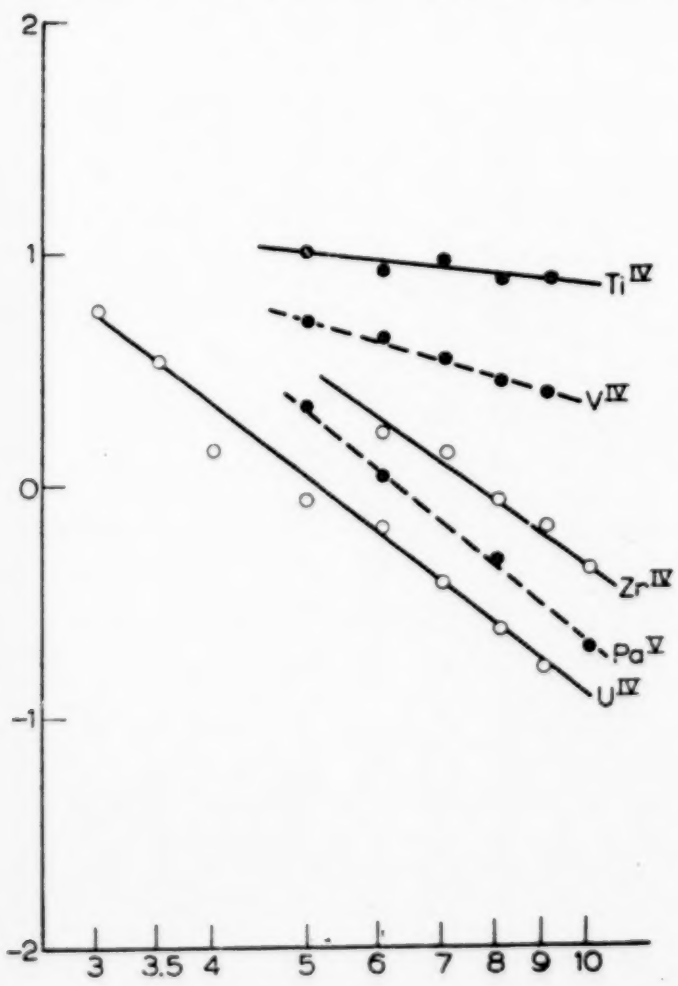


Fig. 6. Graph of R_M values plotted against pCl for Pa(V) and tetravalent cations.

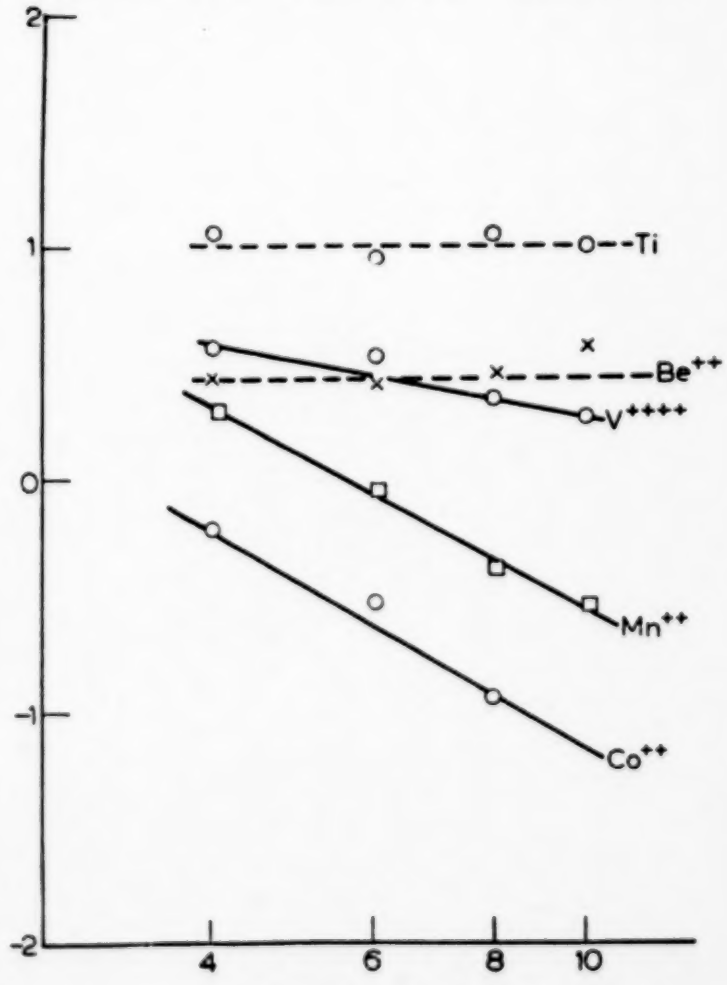


Fig. 7. Graph of R_M values plotted against pCl for several cations.

References p. 178.

possible if one could assume that the partition coefficient depends only on complexation and not also on the solubility of the free and the complex ions in the various solvents.

The most important application that we can suggest for this correlation lies in the possibility of calculating in which region we can obtain the best separation of a given mixture.

When two R_M–pCl lines are parallel the best separation may be obtained when both R_M values are nearest to R_M 0; when they are divergent the greatest R_M difference yields the greatest R_F difference.

SUMMARY

The paper chromatography of Pa(V) in acetone–HCl–water mixtures has been studied. The movement of Pa(V) as well as of other cations may be expressed by the equation

$$-\mathrm{p}K = R_M + 2x\,\mathrm{pCl}^- + K$$

providing the ratio acetone to HCl + water is constant (90:10).

REFERENCES

[1] R. G. DE CARVALHO AND M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 13 (1955) 437; S. KERTES AND M. LEDERER, *ibid*, 15 (1956) 543.
[2] M. LEDERER, *Thèse de doctorat*, Paris, 1954.
[3] A. J. FUDGE AND J. L. WOODHEAD, *Analyst*, 81 (1956) 417.
[4] M. LEDERER AND S. KERTES, *Anal. Chim. Acta*, 15 (1956) 226.

Received July 30th, 1957

PAPER CHROMATOGRAPHY OF WEAKLY POLAR STEROIDS

ADDITIONS TO THE METHOD OF NEHER AND WETTSTEIN

F. J. LOOMEIJER AND GINY M. LUINGE

Institute of Physiology, Department of Physiological Chemistry, The University, Groningen (The Netherlands)

INTRODUCTION

In 1952 NEHER AND WETTSTEIN[1] published a method for separating weakly polar steroids by paper chromatography. A very good separation of many compounds can be achieved with this method, but constant results are only obtained with great difficulty. Other methods were published later by MICHALEC[2] and very recently by MARTIN[3]. Since MICHALEC's method did not give very satisfactory results in the separations the authors wanted to study, the conditions governing the separation by the method of NEHER AND WETTSTEIN were studied.

EXPERIMENTAL

Strips, 42 × 6 cm, were cut from sheets of Whatman No. 1 paper parallel to the machine direction, soaked in a 10% solution of phenylcellosolve in ether, removed from this solution at zero time and blotted between filter paper. Steroids were applied as solutions in ether and the strips exposed to the air at room or other temperature ("temperature of application") until a fixed time starting at zero time had elapsed ("time of application", usually 15 minutes). Immediately afterwards the strips were transferred to the chromatography tanks. Time of running was 135 minutes, ascending technique being used; the mobile phase was heptane saturated with phenylcellosolve. Steroids were detected in the usual manner[4].

RESULTS

The conditions described were varied and their influence on the R_F values of various compounds determined.

(1) The amount of phenylcellosolve in the filter paper largely determines the reproducibility of the R_F values. Optimal results were obtained when the paper contained about 15% phenylcellosolve at the end of the time of application. The influence on the R_F values is shown in Table I.

* Communicated briefly at the International Congress on Clinical Chemistry, Stockholm, Aug. 1957.

References p. 181.

TABLE I

INFLUENCE OF THE AMOUNT OF PHENYLCELLOSOLVE IN THE FILTER PAPER ON THE SEPARATION OF CHOLESTEROL AND CHOLESTENONE

Phenylcellosolve %		*Distance front travelled in 135 min (cm)*	*Δ^4-Cholesten-3-one R_F*	*Cholesterol R_F*
in ether (v v)	*in paper (w w)*			
2.0	1.9	22.3	0.83	0.90
4.0	6.0	22.8	0.70	0.88
8.0	13.4	22.7	0.71	0.82
10.0	14.8	21.8	0.71	0.79
16.0	19.5	18.8	0.63	0.68
20.0	22.3	16.0	0.55	0.41

TABLE II

INFLUENCE OF TIME AND TEMPERATURE OF APPLICATION ON THE R_F VALUES OF VARIOUS COMPOUNDS

A = cholesterol; B = 7*a*-hydroxycholesterol; C = Δ^4-cholestene-3,6-dione; D = cholestane-3,6-dion-5*a*-ol; E = cholesterol palmitate.

No.	*Time (min)*	*Temp. °C*	*R_F*				
			A	*B*	*C*	*D*	*E*
1	10	19	0.65	—	0.28	0.10	—
2	15	0	0.45	0.04	0.24	0.06	0.66
3	15	19	0.71	0.08	0.32	0.11	front
4	15	24	0.79	0.11	0.36	0.14	front
5	20	19	0.92	—	0.35	0.13	—
6	30	19	front	—	0.41	0.14	—

(2) The temperature and time of application had a marked influence on the separation, which is illustrated by Table II. The R_F values of all the compounds used showed a tendency to increase with rising temperature and increasing time of application.

The temperature during the actual chromatography did not have any appreciable influence on the separation.

(3) Mixtures of steroids of very low polarity (cholesterol, cholestanol and cholesterol esters) could be separated on Whatman Nos. 7 and 4, steroids of slightly higher polarity (cholesterol, Δ^4-cholesten-3-one) were preferably separated on Nos. 1 or 3. Mixtures of still higher polarity (steroid diols, diones) were separated by using the solvent system methylcellosolve–heptane instead of phenylcellosolve.

DISCUSSION

It is evident from the data given that the amount of phenylcellosolve in the paper, the time and the temperature of application should be kept strictly constant in order to obtain identical results. NEHER AND WETTSTEIN have mentioned the possibility that the impregnated paper could absorb water during exposure to the humid

References p. 181.

air—we, however, have never been able to demonstrate any influence of the relative humidity of the air on the separation. A few experiments with paper strips exposed to water vapour *before* impregnation showed that R_F values do increase when water is added to the system.

The influence of time and temperature of application on the separation provides a way of resolving mixtures of steroids of quite different polarity.

Table II (Nos. 2–4) shows that a mixture of very weakly polar steroids is separated when the time of application is short (15 min or less) and the whole procedure is performed in the cold room. A mixture of steroids of higher polarity is separated under the opposite conditions (Table II, Nos. 5 and 6), when the time of application is 15–30 min and the temperature is 19° or higher.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was carried out as a part of the programme of the Research Group on Atherosclerosis at the University of Groningen, with financial aid from the Health Organization T.N.O.

The authors are indebted to Dr. G. J. SCHURINGA and Dr. F. J. RITTER of the Central Laboratory T.N.O. for valuable discussions.

SUMMARY

Some important conditions governing the separation of weakly polar steroids by paper chromatography according to the method of NEHER AND WETTSTEIN have been studied. It was shown that the reproducibility of the results was largely determined by the amount of cellosolve in the paper. Separation of mixtures of compounds of different polarity could be achieved by varying the conditions to which the impregnated paper was exposed before chromatography.

REFERENCES

1 R. NEHER AND A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 276.
2 C. MICHALEC, *Experientia*, 13 (1957) 242.
3 R. P. MARTIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 408.
4 E. LEDERER AND M. LEDERER, *Chromatography*, 2nd ed., Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1957, p. 279.

Received October 4th, 1957

PORTABLE APPARATUS FOR PAPER ELECTROPHORESIS

ITS APPLICATION TO PRELIMINARY ANALYSIS OF CURARIZING ALKALOIDS IN PLANTS AND CURARES*

G. B. MARINI-BETTOLO AND JUAN A. COCH FRUGONI
Laboratory of Therapeutical Chemistry, Istituto Superiore di Sanità, Rome (Italy)

The possibility of a rapid analysis of organic mixtures, offered by paper electrophoresis, has been described in a previous paper[1].

With this method the presence of alkaloids can be detected in botanic samples up to two hours after they have been gathered, and it may also be utilized for the identification of other substances in extracts.

In the systematic study of South American *Strychnos* alkaloids, one of the problems facing the botanist, who is often collecting samples far away from human habitation, is to determine whether they contain alkaloids at all and, if so, in appreciable quantities[2].

Chromatic reactions are not always feasible in the case of crude plant extracts owing to the presence of resins and soluble proteins, which may give similar responses. However, by first submitting the extracts to paper electrophoresis, it is possible to separate in one hour alkaloids from the other constituents, and then detect them by specific reactions.

Performing paper electrophoresis in the field, however, usually presents difficulties since it requires a direct current supply of about 300 volts and 2–10 mA. Hence our aim was to design a not too cumbersome portable apparatus with which paper electrophoresis is possible even in places not provided with electric power.

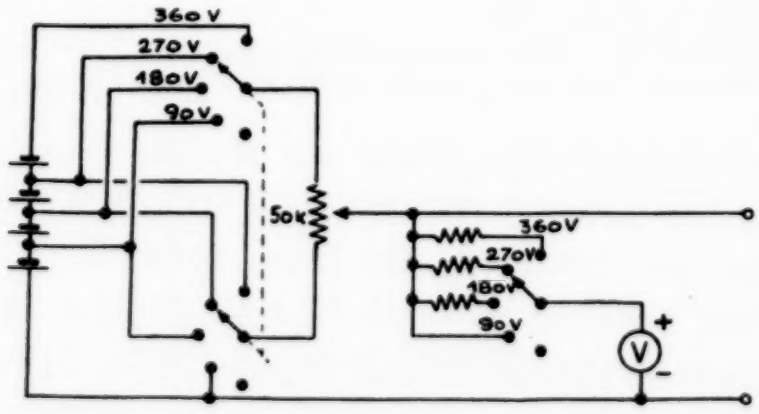


Fig. 1. Electrical circuit of the portable electrophoresis apparatus.

The apparatus consists of a 360 volts dry battery generator adjustable by means of a potentiometer and read on a voltmeter according to the circuit shown in the diagram (Fig. 1).

---

* Communication presented to the International Symposium on Curare and Curarizing Substances, Rio de Janeiro, 5–12 August 1957.

References p. 185.

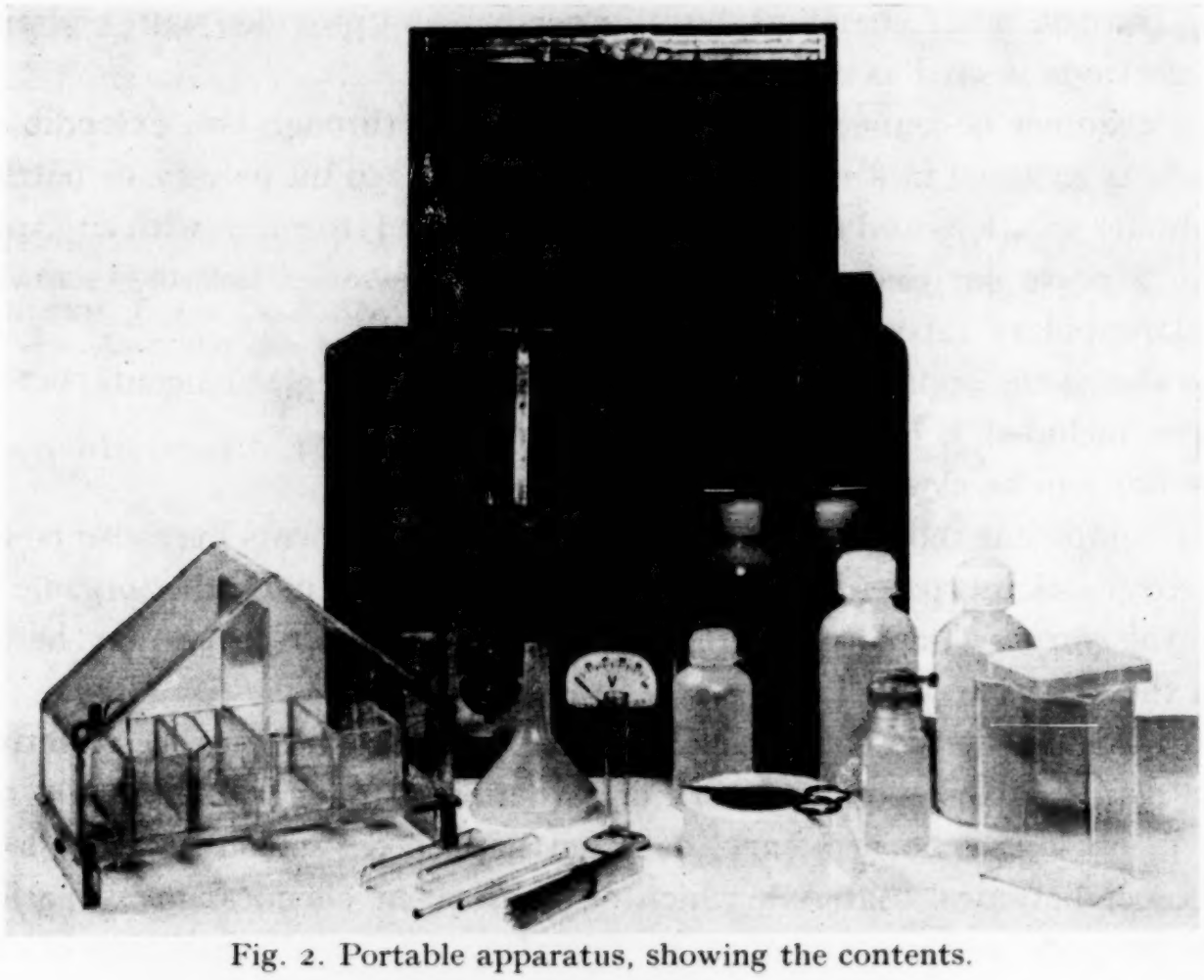


Fig. 2. Portable apparatus, showing the contents.

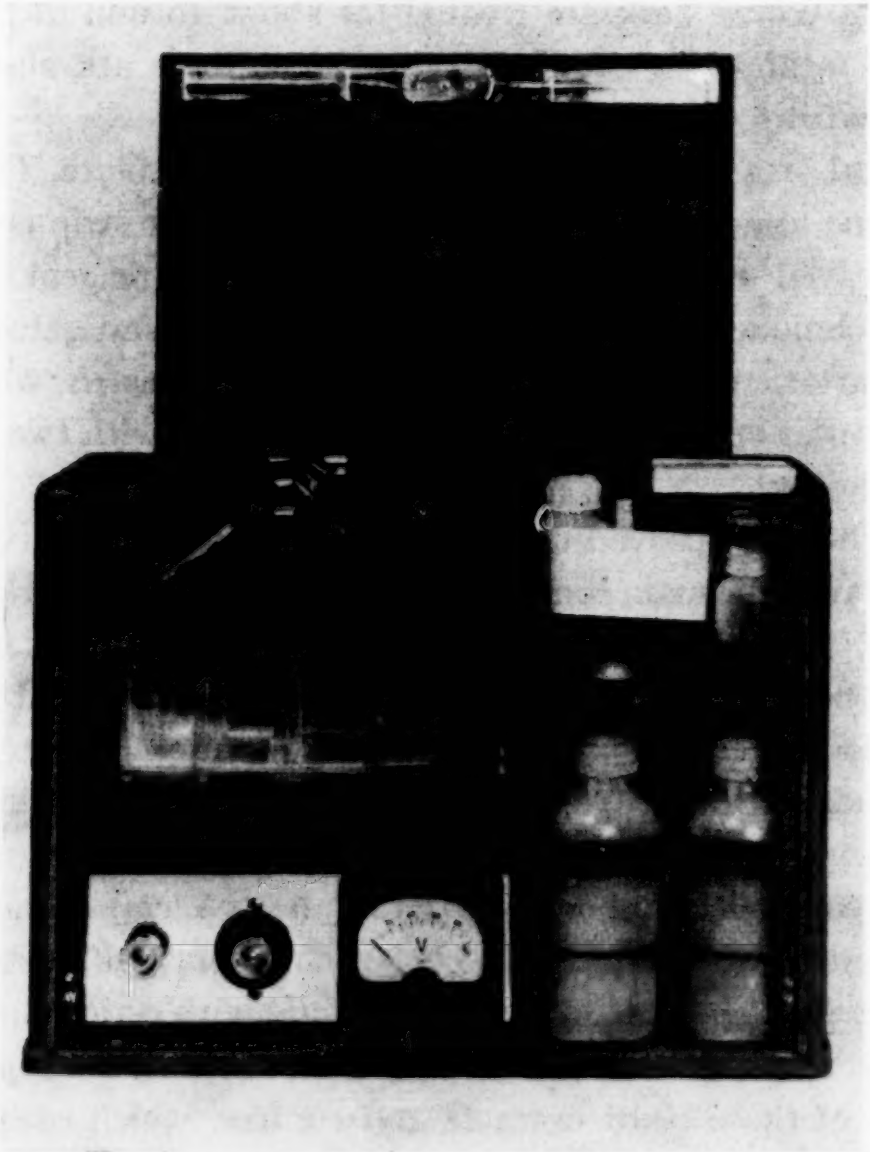


Fig. 3. Portable apparatus, ready for transport.

The Durrum moist chamber[3], built in perspex and provided with a platinum or carbon electrode is used as electrophoretic apparatus.

This chamber is connected to the power supply through two extendible wires. The whole is enclosed in a metal box, in which four 250 ml polythene bottles containing buffer solutions and reagents may also be placed, together with a roll of Whatman No. 1 paper for electrophoresis, and other accessories (scissors, screwdrivers, glass rods, capillary tubes, funnel, etc.).

The size of the apparatus is 35 × 27 × 16 cm; its weight, reagents, buffers and accessories included, is 6.650 kg (see Figs. 2 and 3).

The box can be closed and handled easily.

This equipment though planned for chemical requirements may also be used for clinical diagnostic purposes in the analysis of blood serum and other organic liquids.

For this purpose, in places where current is available a rectifier may be used instead of the dry battery.

With this device the botanist will be able to detect the presence of active principles in plants on the spot. The work of gathering samples will be greatly reduced, for it will no longer be necessary, as often happened previously, to collect great quantities of botanical material, which on subsequent chemical investigation may prove to be quite useless; moreover, by operating with small quantities of the bark of a given plant the variation may be followed up in the field.

0.1–0.2 g of *Strychnos* bark are treated for about 10 min in 2–3 ml of tartaric acid solution. By means of a capillary tube a few drops are placed on a strip of Whatman No. 1 paper for electrophoresis.

5% acetic acid or a Britton buffer are used as electrolyte. The electrophoresis is carried out in the usual manner; after drying, the paper strip is examined in U.V. light and then sprayed with ceric sulphate or iodoplatinic reagent.

Using this technique crude plant extracts may be investigated. In this way we have examined tartaric extracts of *S. Froesii* and *S. guianensis*, which yielded after electrophoresis a series of bands similar to those obtained with two purified alkaloids as described previously[4].

This method has also proved useful for studying artificial mixtures of alkaloids such as Indian curares, the main constituents of which can thus be rapidly determined.

For example, when studying a curare from Iquitos (Peruvian Amazonia) and using a solution obtained by diluting the drug with tartaric acid solution, we were able to observe the presence of an intense band (100 mm; pH 2; 15 V/cm; 1.30 h), which with the iodoplatinic reagent became strongly U.V.-absorbing and which we identified as tubocurarine.

Further, the paper electrophoresis (pH 12; 3 h; 15 V/cm) of the curare of *Macusi indios* shows several bands (one of which is fluorescent); of these, one turns blue (120 mm) and two pinkish purple (58 mm; 110 mm) with ceric sulphate reagent.

The band that turns blue contains curarine, as was proved by spectrophotometry.

The analysis of these plant extracts and curares, which can be carried out in one hour at most and which reveals the alkaloid group present, proves the effectiveness

References p. 185.

of the reported method for the rapid analysis and detection of active principles in biological materials.

REFERENCES

[1] G. B. MARINI-BETTOLO AND J. A. COCH FRUGONI, *Farmaco (Pavia), Ed. pract.*, 12 (1957) 329.
[2] G. B. MARINI-BETTOLO, *Arthur Stoll Festschrift*, Birkhäuser, Basel, 1957, p. 256.
[3] E. L. DURRUM, *J. Am Chem. Soc.*, 72 (1950) 2943.
[4] G. B. MARINI-BETTOLO AND M. LEDERER, *Nature*, 174 (1954) 133;
G. B. MARINI-BETTOLO, M. LEDERER, M. A. IORIO AND A. PIMENTA, *Gazz. chim. ital.*, 84 (1954) 1155;
G. B. MARINI-BETTOLO AND M. A. IORIO, *Gazz. chim. ital.*, 84 (1954) 1305.

Received November 26th, 1957

CONTINUOUS FILTER PAPER ELECTROPHORESIS OF TOBACCO MOSAIC VIRUS

MILTON ZAITLIN*

Division of Plant Industry, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Canberra, A.C.T. (Australia)

I. INTRODUCTION

Continuous electrophoresis on filter paper can be a useful technique in the preparation and purification of proteins. It differs significantly from either boundary electrophoresis or zone electrophoresis on filter paper in that it is principally a preparative rather than an analytical tool. In an earlier short communication[1] the reisolation of the individual strains from a synthetic mixture of two strains of purified tobacco mosaic virus (TMV) was reported. The separation of the two strains was a complete one as the biological integrity of each strain was regained after continuous electrophoresis. This paper extends the description of the electrophoresis technique and its effect on some biological and physical properties of the virus. In addition, the feasibility of purifying TMV without resorting to either chemical purification or high speed centrifugation has been investigated, and the purification of a low molecular weight protein associated with TMV infection is reported.

KARLER[2], in a brief abstract, has reported the isolation of poliomyelitis virus directly from its culture medium by continuous electrophoresis. He has also examined TMV, but no details are given.

II. MATERIALS AND METHODS

Virus preparations

Inoculum of Strains U1 (common) and U2 (mild mosaic) of TMV was obtained from Dr. S. G. WILDMAN. The origins and symptoms produced on tobacco plants are reported in detail by SIEGEL AND WILDMAN[3]. The virus was purified from infected *Nicotiana tabacum* var. Turkish Samsun plants in a manner analogous to that described by SIEGEL AND WILDMAN[3], but using water or dilute phosphate buffer rather than cacodylic acid buffer as the grinding medium. Generally, two or sometimes three cycles of high and low speed centrifugation were adequate to give a preparation

* Address after July 1, 1958: Department of Horticulture, University of Missouri, Columbia, Mo. (U.S.A.).

References p. 199.

suitable for continuous electrophoresis. The virus preparations were dialyzed at 2° C for at least 24 hours in a buffer similar to the buffer subsequently used when the virus was subjected to continuous electrophoresis.

Virus nitrogen was estimated by digestion and direct Nesslerization. The protein concentrations were calculated from the nitrogen determination, assuming 16% nitrogen for the proteins.

Virus bioassay

Except where indicated in the text, the half-leaf assay method using *Nicotiana glutinosa* plants was used to estimate relative virus activity. A randomized block design of 13 six-leaved plants, with each treatment replicated 24 times was employed to minimize the variation between plants, and between leaf levels on individual plants. The plants were kept in the dark for 18 hours before inoculation to increase their sensitivity to the virus. 50 mg of Celite was added to each ml of virus inoculum as an abrasive.

Continuous electrophoresis

The electrophoresis cabinet was purchased from the Shandon Scientific Company, London. Two additions to the basic apparatus enabled operation without attention for periods of up to 24 hours; *viz.*, a motor-driven syringe to apply the protein solutions to the filter paper, and a pumping system to recirculate the buffer through the dialysis tubing enclosing the platinum side electrodes.

The motor-driven syringe device (after HOLDSWORTH[4]) was bolted to the front panel of the cabinet. The protein solution was applied to the paper from an all-glass 5 ml hypodermic syringe through polythene tubing, at the rate of approximately 0.2 ml per hour. In an experiment where the rate of application of the protein to the paper was increased to 0.4 ml/h, a poor separation resulted as the applied protein solution moved faster than the buffer curtain. The syringe mounting was designed so that the position of the application of the protein to the paper could be varied. Generally, with electrodes 40 cm apart, the protein was applied 13.5 cm from the cathode and about 5 cm above the top of the electrode wires which were clamped to the vertical edges of the paper. The effective length of the paper over which the protein migrated was approximately 50 cm.

The pumping system assured circulation of ample quantities of buffer through the dialysis tubing which encased the electrodes. About one liter per hour per electrode was required to flush properly the products of electrolysis (in this case hydrogen and oxygen). With rates much lower than this, pH changes at the electrodes caused a disturbance of the migration of the proteins and anomalies resulted. After flushing the electrodes, the buffer from both electrodes drained into a common vessel; it was then pumped into two large beakers above the apparatus which contained the buffer supplies for the individual electrodes. The two beakers were interconnected with a ¼" I.D. rubber tube to keep their levels equal. This interconnection represented a shunt to the high voltage system; approximately 30% of the total current was carried

References p. 199.

here. A diaphragm-operated microswitch activated the pump according to the water pressure in the lower vessel.

In any experiment, the flushing buffer was always taken from the same source as the buffer which was allowed to flow down the filter paper (the buffer curtain).

The $M/90$, pH 7 phosphate buffer contained 0.0044 moles of KH_2PO_4 and 0.0066 moles of Na_2HPO_4 per liter. The ionic strength was 0.024.

A DC power supply, with full-wave rectification, operated as a constant voltage device, gave a regulated output of $\pm$ 1%. A potential of 460 volts was applied across the electrodes. With electrodes 40 cm apart, at 2° C the current across the paper was about 3 milliamperes. Because of the small amount of power to be dissipated, there was no apparent heating at the surface of the filter paper.

HOLDSWORTH[4] has investigated several Whatman filter papers suitable for the separation of proteins by continuous electrophoresis. From these, Whatman No. 3MM and Whatman No. 54 were examined for their suitability in the separation of TMV strains. No. 3MM has a very low wet strength and its use was abandoned in favour of No. 54, which is a very tough paper and can be handled easily when wet without much danger of tearing. In most experiments the paper was washed with 1 N HCl for one hour, and then rinsed for 24 hours in several changes of distilled water.

The buffer curtain which travelled down the paper collected into a series of 30 tubes placed at drip points cut into the bottom edge of the paper. After each electrophoretic run was completed, the tubes into which the protein had migrated were identified either by a precipitin test with TMV antiserum, by absorption at 260 and 280 mμ in a Beckman Model DU spectrophotometer, or by the staining of the paper with bromophenol blue[5] after heating for 20 minutes at 110° C[6].

In early experiments, the apparatus was run at room temperatures (about 20–25° C). Contaminations by microorganisms in the circulating buffer proved troublesome, and as will be shown below, the Strain U2 virus, after electrophoresis, retained only about 10% of its original infectivity. All subsequent experiments have been performed with the apparatus in a room held at 2° C.

III. EXPERIMENTAL RESULTS

The effect of continuous electrophoresis on the biological activity of the virus

The infectivity per unit protein which was retained by centrifugally purified Strain U2 after it had been subjected to continuous electrophoresis was determined by bioassay on *N. glutinosa*. After electrophoresis, the liquid in those tubes which contained the virus was pooled and the solution was dialyzed for at least two days at 2° C in $M/90$ pH 7 phosphate buffer. Another sample of the same lot of Strain U2 which had not been subjected to continuous electrophoresis, but which had been stored at 2° C, was dialyzed in the same buffer. In experiments where the filter paper had not been acid washed, significant quantities of a dialyzable, nitrogenous substance came from the paper. The dialysis of the U2 virus after electrophoresis was considered to be complete when no nitrogen could be detected in a control dialysis sample

References p. 199.

consisting of buffer which had also travelled down the paper, but which contained no virus.

After dialysis, the two virus samples were diluted in *M*/90 pH 7 phosphate buffer to the levels shown in Table I. In all experiments, the infectivities were compared at three virus concentrations. In Experiment 1A and 1B the electrophoresis was at room temperature; only about 10% of the original infectivity remained after electrophoresis. Experiments 2, 3, and 4—performed at 2° C—suggested that Strain U2 retained full infectivity after continuous electrophoresis.

TABLE I

THE EFFECT OF CONTINUOUS ELECTROPHORESIS ON THE INFECTIVITY OF STRAIN U2

Values expressed as the ratio of the number of lesions produced on *N. glutinosa* in response to virus that was subjected to continuous electrophoresis, to the number of lesions produced with the same preparation of virus that had not undergone electrophoresis.

Virus concentration at which the comparison was made (mg/ml)	*Experiment number*				
	*1A**	*1B*	*2*	*3*	*4***
	Electrophoresis at room temperature (20–25° C)		*Electrophoresis at 2° C*		
$5 \cdot 10^{-3}$			0.6	0.9	1.4
$2.5 \cdot 10^{-3}$		0.08			
$1 \cdot 10^{-3}$			0.7	0.9	1.0
$5 \cdot 10^{-4}$	0.05	0.08			
$2 \cdot 10^{-4}$			0.9	1.2	1.2
$1 \cdot 10^{-4}$	0.08	0.1			

* Experiments 1A and 1B represent separate bioassays on virus taken from one electrophoretic separation.

** Electrophoresis on acid-washed paper.

The trends seen in Experiments 1, 2, and 3, where the ratio of infectivity before electrophoresis to infectivity after electrophoresis increased with increasing dilution of the virus suggested that a substance inhibitory to virus infectivity might be originating from the filter paper. However, it was not possible to demonstrate such a substance in buffer extracts of the filter paper.

The electrophoretic separation of two TMV strains after isolation from mixedly infected plants

In an earlier report[1] the reisolation of the individual strains of a synthetic mixture of purified Strains U1 and U2 was reported. Similar experiments have now been performed with the two strains as isolated simultaneously from mixedly infected plants.

The strain composition of virus isolated from mature, directly inoculated tobacco leaves has been shown to approximate closely the strain composition of the inoculum used to infect them[7]. In order to obtain a strain mixture composed of approximately equal amounts of each component, the protein concentrations of U1 and U2 were adjusted to give equal levels of infectivity (as determined by prior

References p. 199.

bioassay on *N. glutinosa*) and rubbed onto mature *N. tabacum* leaves. The virus was subsequently isolated from these leaves, purified centrifugally, and subjected to continuous electrophoresis. As in the case of the synthetic mixture[1], the two strains could be separated by continuous electrophoresis so that the biological integrity of the individual strains (symptoms on *N. rustica*) could be regained.

SINGER *et al.*[8] have examined virus purified from plants dually infected with Strains U1 and U2 (then named Severe and Mild, respectively) in the moving boundary electrophoresis cell and have observed in addition to U1 and U2 a third component of intermediate mobility. This component (I) is thought to be a centrifuge artifact consisting of an aggregation product of Strains U1 and U2. With continuous electrophoresis no component comparable with Component I reached the bottom of the filter paper, although in some of the experiments at least one other component appeared to be present between U1 and U2 immediately below the point of application of the protein to the paper.

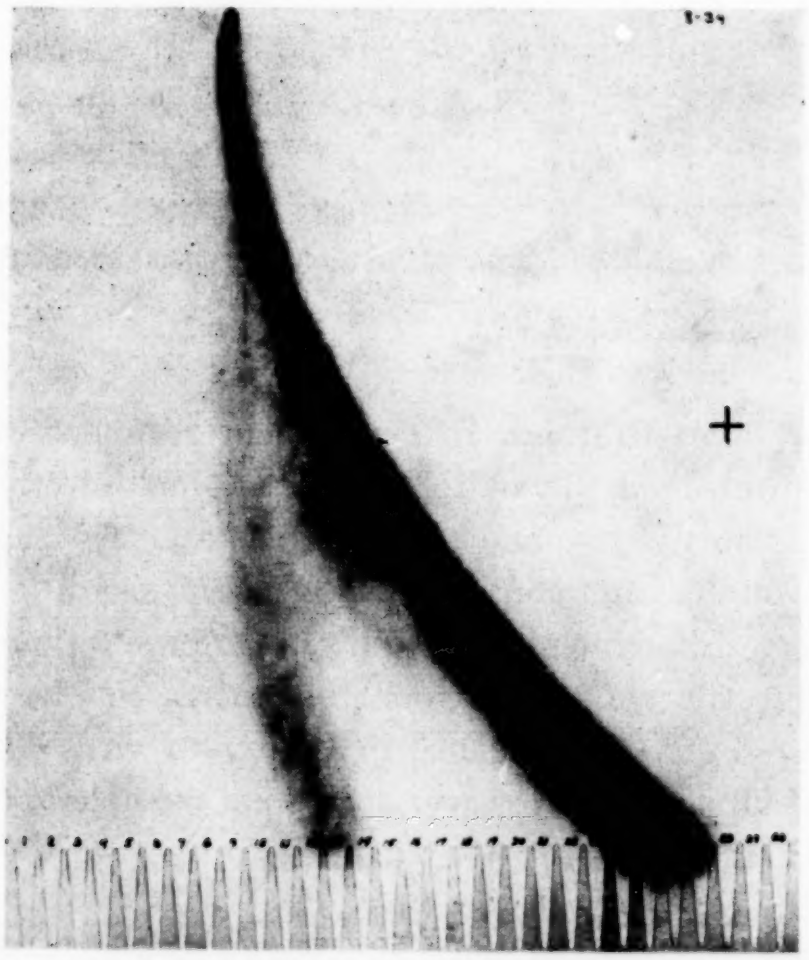


Fig. 1. Stained filter paper after continuous electrophoresis of a mixture of Strains U1 and U2 which were individually purified and then centrifuged together. The components from left to right are: Strain U2, Component I (see text), and Strain U1.

Strains U1 and U2 purified individually and then sedimented together in the high speed centrifuge also show the presence of Component I in the boundary electrophoresis diagram[8]. U1 and U2 mixtures prepared in this manner were also utilized in an attempt to isolate Component I by continuous electrophoresis—without success. Fig. 1 shows a stained filter paper from one of these experiments. This paper is somewhat atypical, in that the movement down the paper of the component assumed

References p. 199.

to be I is the greatest ever observed, but it is depicted to illustrate a point in the discussion section of this paper.

Purification of virus from plant tissue homogenates

TMV is normally purified from leaf sap or leaf homogenates either by high speed centrifugation or salt precipitation. Continuous electrophoresis differs in principle from either of the above as a technique for the purification of proteins; hence, it was of interest to determine whether TMV could be isolated directly from leaf homogenates by continuous electrophoresis.

Virus-containing leaves of each strain (60 g) were ground in 150 ml of distilled water, the homogenates were filtered through glass wool and centrifuged for 30 minutes

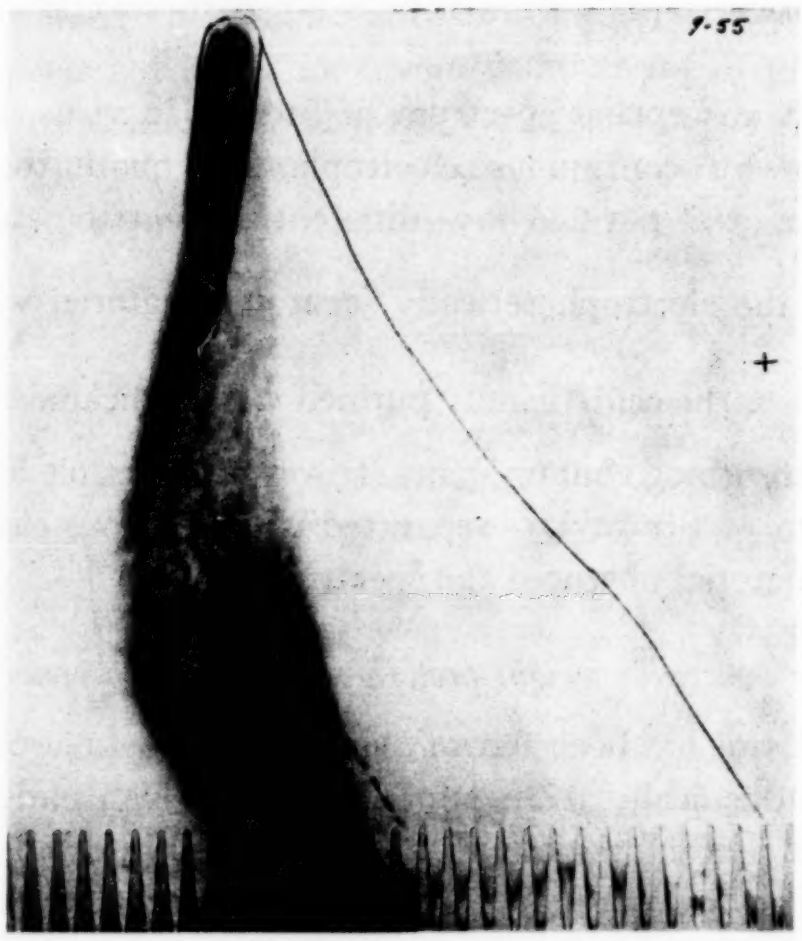


Fig. 2. Stained filter paper of Strain U2 purified directly from an homogenate of diseased leaves. The virus is represented by the streak on the left.

at 3500 *g* to remove cell debris. Before subjecting the homogenates to continuous electrophoresis it was necessary to reduce their volumes, as the maximum flow rate which could be handled on No. 54 paper was about 0.2 ml per hour. Concentration to about 20 ml was effected in a rotary evaporator operated so that the temperature of the water bath did not exceed 60° C*. The concentrated extract was centrifuged at 3500 *g* for 30 minutes, and the supernatant solution was dialyzed in the cold for 24

* At the time of these experiments the deleterious effect of heating the virus, with the concomitant modification of its aggregation state and behaviour on the paper was not appreciated. However, virus did migrate on the filter paper, and heating probably did not affect the general conclusions from this type of experiment.

References p. 199.

hours in several changes of distilled water. Dialysis increased the volume of the concentrate, necessitating reconcentration to about 20 ml by rotary evaporation. A final dialysis in $M/90$ pH 7 phosphate buffer yielded a liquid, dark brown in colour, which was subsequently subjected to continuous electrophoresis.

A filter paper taken from a typical experiment with Strain U2 is shown in Fig. 2. The pencilled lines delineate the areas of the paper occupied by the brown material which is visible before staining with bromophenol blue. The trailing edge of the streak is dotted, as the edge of the boundary was not easily defined. Virus-containing material (determined by serological test) occurred in the tubes which collected liquid from beneath the streak on the left. In these experiments the virus exhibited much more spreading on the paper than experienced with centrifugally purified virus.

Strain U1 and the brown material migrated to a similar position on the paper. Electrophoresis at several pH's from 6 to 8 failed to separate the virus from the brown material.

The ultra-violet absorption spectrum of Strain U2 virus, isolated from plant tissue homogenates by continuous electrophoresis qualitatively resembled the spectrum of Strain U2 purified by differential centrifugation. However, the $E\frac{260m\mu}{280m\mu} = 1.11$ of the electrophoretically separated material when compared with the $E\frac{260m\mu}{280m\mu} = 1.21$ of the centrifugally purified virus indicated that the former contained ultra-violet absorbing contaminants. It was not possible to examine the UV absorption spectrum of Strain U1, separated by continuous electrophoresis, as the ubiquitous brown material obscured the spectrum.

Purification of a low molecular weight protein associated with virus infection

Virus-diseased leaf tissue has been shown to contain at least one low molecular weight protein which is antigenically related to TMV, and which under conditions of low pH and/or high salt concentration may be polymerized into rods[9] of the diameter of TMV rods, but of varying length[10]. The biological significance of this protein is not clear, but it has been shown not to be an artifact of preparation or a decomposition product of the virus[11]. Following the terminology of JEENER AND LEMOINE[12] the term "soluble antigen" (antigen) will be used to refer to this protein.

Soluble antigen-containing material was prepared by a method slightly modified from DELWICHE *et al.*[11]. Systemically infected leaves or leaves directly inoculated with Strain U1 some 17–52 days previously were employed. The leaves were ground in two times their weight of $M/90$ pH 7 phosphate buffer and the homogenates filtered through glass wool and subjected to low speed centrifugation (3500 *g* for 20 minutes). The resultant supernatant liquid was centrifuged at 100,000 *g* for 1 hour to remove the virus. In an attempt to minimize contamination by virus the supernatant fluid was carefully removed with a syringe, leaving about ½" of liquid over the pellet. Some of the preparations were frozen at this point without apparent effect on subsequent purification. The pH of the fluid (6.2–6.6) was then brought to 4.7 using

References p. 199.

1 *N* hydrochloric acid. After standing for about 18 hours at 2° C, the flocculated material was removed at 3500 *g* (20 minutes) and was discarded. Centrifugation of the pH 4.7 supernatant at 100,000 *g* for one hour, followed by the rinsing of the pellet and tube with water, resuspension in *M*/90 pH 7 phosphate buffer, and dialysis yielded the soluble antigen-containing material which was subjected to continuous electrophoresis. Conditions of continuous electrophoresis (at 2° C) were identical with those used for the virus.

The antigen migrates to a position which would give an apparent mobility slightly less than that of U2 in the virus experiments (Fig. 1). Its behaviour on the paper, however, was quite different from that of the virus; the yields of antigen were much greater, indicating very little adsorption. An additional 12 hours electrophoresis after the last of the protein was applied to the paper was sufficient to elute it.

The tubes containing the soluble antigen (determined by spectrophotometric examination) were pooled, dialyzed for several hours in 0.1 *M* pH 4.7 acetate buffer, and then antigen was reconcentrated by centrifugation at 100,000 *g* for one hour.

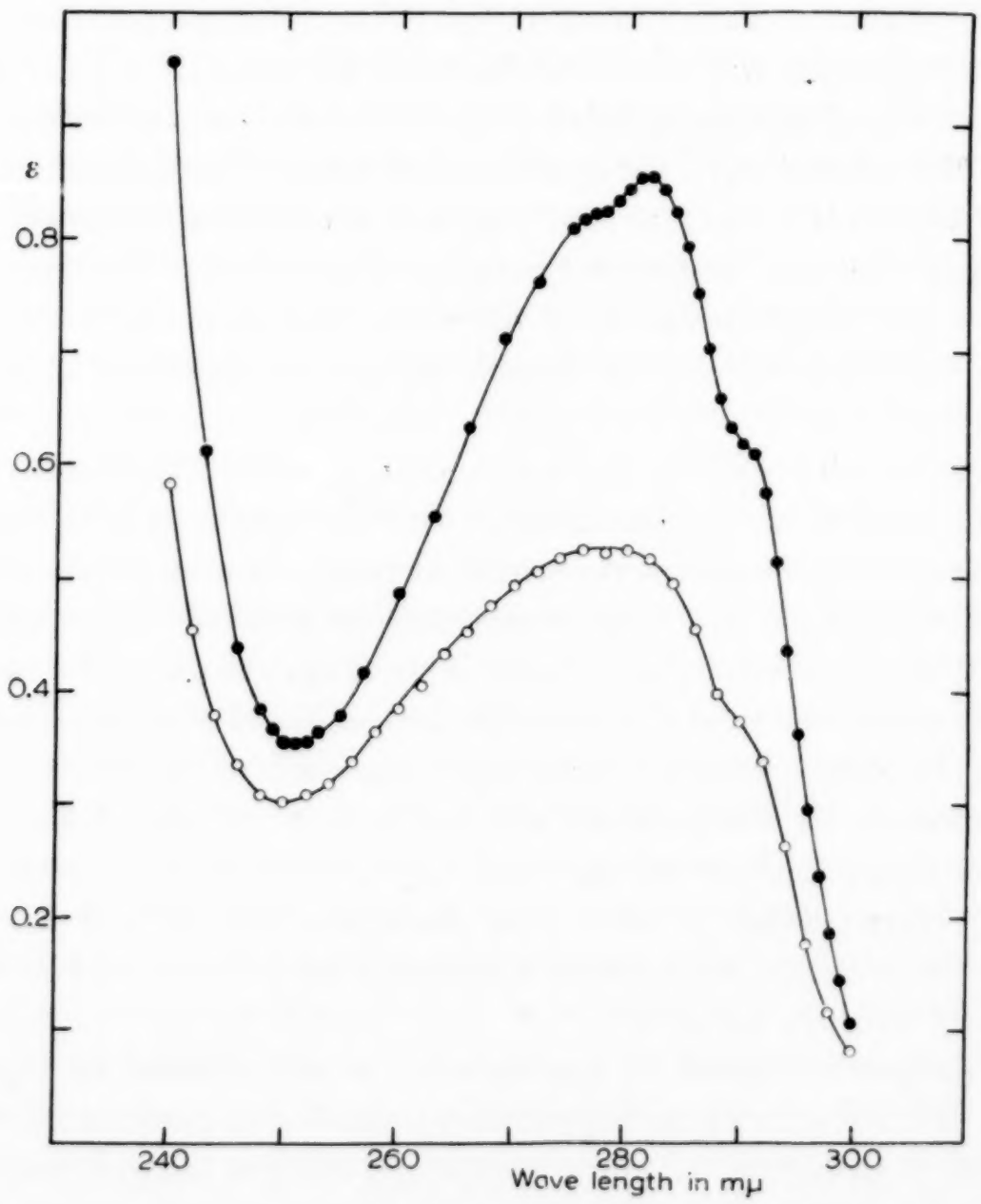


Fig. 3. Ultraviolet absorption spectra of purified soluble antigen of TMV —●—●— and antigen-containing material as applied to the continuous electrophoresis filter paper —○—○— in *M*/90 phosphate buffer, pH 7.

References p. 199.

The subsequent pellets were usually clear and gelatinous and resuspended within a few hours in $M/90$ pH 7 phosphate buffer at 2° C. In some preparations, however, the pellet contained some opaque material which failed to resuspend. The solutions were clarified by centrifugation at 10,000 *g* for 30 minutes. Dialysis *vs.* pH 4.7 buffer elicited the striking change in the light scattering properties of the antigen, originally observed by TAKAHASHI AND ISHII[9], and in all likelihood represented the aggregation of this protein into rod-shaped particles.

The UV absorption spectra of the purified soluble antigen and an example of the antigen-containing material applied to the electrophoresis filter paper are shown in Fig. 3. The $E\frac{1\%}{280m\mu}$ (1 cm light path) of the purified antigen, based on nitrogen determination, assuming 16% N, is 12.7–12.8 (three preparations). These values are not corrected for light scattering.

15 mg of soluble antigen was examined for nucleic acid content by hydrolysis and subsequent paper chromatographic isolation of bases and nucleotides; none were detected. Judging from TMV similarly examined as a control, the lower limit of detection establishes a maximum of 0.05% RNA in this preparation.

The soluble antigen was also examined for its infectivity by comparing the number of lesions produced on 24 half-leaves of *N. glutinosa* with lesions produced in response to TMV rubbed onto the opposite half-leaves. Comparing soluble antigen at 0.5 mg/ml with TMV (U1) at 10^{-3} mg/ml, the values obtained were 0 and 146 lesions per half-leaf respectively. In this laboratory, U1 may be detected with certainty on *N. glutinosa* at a minimum concentration of $5 \cdot 10^{-5}$ mg/ml. The upper limit of infectivity of the soluble antigen is, therefore, 0.01% of that of the virus.

In the Tiselius cell at pH 6.9 in 0.1 μ cacodylate–NaCl buffer[8] a 0.5% solution of the antigen migrated as a single component with no suggestion of heterogeneity.

Continuous electrophoresis of the soluble antigen-containing leaf extract prepared as above always yielded at least two components in addition to the soluble antigen. Small amounts of a fast-moving component were always found; this material did not stain when the paper was treated with acidic bromophenol blue, and from its absorption spectrum (E 260mμ/280mμ = 1.85–1.96) appeared to be rich in nucleic acid. Another component (or components) moving in front of the soluble antigen and spreading over a large number of tubes also appeared to be nucleoprotein in nature and probably corresponded to some host nucleoproteins. It was not determined whether these components were unique to infected leaves, but neither was infectious nor would react with U1 antiserum.

Soluble antigen is capable of aggregation—being sensitive to changes in ionic strength and pH[9]. In many of the experiments involving its purification by continuous electrophoresis, a portion of the antigen appeared to be in an aggregated form which migrated on the paper to a position slightly behind that normally experienced with U1 virus. The tendency to aggregate occurred principally when directly inoculated leaves were used as a source of antigen and was minimized with young, systemically

References p. 199.

infected leaves*. Aggregation in effect resulted in a net loss of part of the soluble antigen during the process of purification, as the aggregated material was strongly adsorbed to the paper and little or none was eluted during the 1.5–3 days of the electrophoresis.

IV. DISCUSSION

Recently, virus which had migrated down the paper has been examined with the electron microscope. A marked heterogeneity of the virus contained in the several tubes into which each strain collects, and a significant qualitative difference in particle size of the virus after migration down the paper has prompted a further study of the fate of the virus on the paper. This work, in collaboration with Dr. J. N. PHILLIPS and Miss M. BRIGGS is in progress and will be published in detail later, but some of the conclusions drawn are important in discussing the data described above.

The purified Strain U1 virus material which is applied to the paper contains a proportion of rods which are much longer than 300mμ—the length of the TMV monomer. These long rods are conspicuously absent in the virus which is collected from the paper—no rods much longer than 300mμ have been observed. Long rods appear to be strongly adsorbed and treatments which aggregate the virus end to end would tend to restrict its movement on the paper. It has been observed that heat treating the TMV during purification, or allowing it to stand in phosphate buffer for a considerable time after purification reduces the rate of virus movement down the paper. In one striking case, a preparation of a U1/U2 mixture which migrated normally when subjected to electrophoresis shortly after centrifugal purification, failed to migrate from the point of application when examined after 9 months' storage at 2° C in pH 7 phosphate buffer.

The rate of migration down the paper of different preparations of freshy purified virus is in itself somewhat variable. It appears likely that some uncontrolled factor in the centrifugal purification of the virus, for example, the length of time the unpurified virus remains in the presence of the leaf homogenate (suggested by PIRIE[13]) may influence its state of aggregation, and, hence, its behaviour on the filter paper.

TMV was examined by continuous electrophoresis principally in the vicinity of pH 7. Below pH 7 the protein becomes increasingly adsorbed to the paper, and at about pH 5 the virus does not migrate from the point of application to the paper. The two strains studied differ widely in electrophoretic mobility between pH 5 and 8[14] and good separations with continuous electrophoresis are easily achieved at pH 7 and above, where adsorption is minimized. In an earlier study of a naturally occurring mixture of viruses isolated by centrifugation from *Cattleya* orchid plants, moving boundary electrophoresis indicated a separation into two components at pH 5.8 or 5.1, whereas at pH 7 only one peak was in evidence[15]. Adsorption of the virus to the

* This observation does not reveal whether aggregation exists within the host cell, or whether it occurs after rupture of the cell, as a result of the conditions of pH or ionic strength resulting therefrom.

References p. 199.

paper at low pH has precluded any separation of these two viruses by continuous electrophoresis.

Adsorption to the filter paper probably explains the failure to obtain Component I, the intermediate component between U1 and U2 originally observed in the Tiselius cell by SINGER *et al.*[8]. Component I is most easily interpreted to contain equal amounts of U1 and U2 protein. The fact that it is so strongly adsorbed to the filter paper (Fig. 1) suggests that it is aggregated to a dimer or higher.

The position to which a component will migrate on the filter paper appears to be influenced not only by its charge, but also by its relative adsorption to the paper. Where it has been possible to make comparative measurements the proteins investigated have a lower mobility on filter paper than would be expected from measurements of their mobilities in a Tiselius cell. For example, Strain U2 and the soluble antigen exhibit almost a zero mobility (or on occasion a positive mobility) on the filter paper, whereas in boundary measurements their mobilities are $-4.9 \cdot 10^{-5}$ and $-3.6 \cdot 10^{-5}$ $cm^2 volt^{-1} sec^{-1}$, respectively. Also, the position of migration of the components on the paper with respect to one another cannot be predicted from moving boundary measurements alone. The example of Strain U2 and the soluble antigen may again be cited; a more direct comparison is provided in Fig. 1, where it may be seen that the mobility of the middle component assumed to be I is not midway between U1 and U2 as it is during electrophoresis in free solution[8,7], but is displaced towards the anode.

These facts suggest that the adsorption of the proteins to the filter paper influences the horizontal component of migration to a greater extent than the vertical component. This could arise from the interplay between the endosmotic and electrophoretic forces leading to an oriented adsorption of the virus particles on the paper*.

An apparently similar effect of adsorption may be seen in a diagram of a starch electrophoresis isolation of two strains of TMV and their intermediate component presented by PAIGEN[16].

The behaviour of TMV on filter paper has been investigated during chromatography[17,18,19] and zone electrophoresis[18,20]. With aqueous solvents the virus appears to show considerable adsorption to the paper. GRAY[18], using purified TMV and zone electrophoresis found that the virus remained at the origin at pH 7, although it migrated with considerable tailing at pH 8.6. The virus did migrate from the origin at pH 7 when extracts of diseased plants, rather than purified virus were examined. In this regard it is of interest to note that the virus has a low mobility on paper —appearing behind the bulk of the host protein[18,20] in contrast to its behaviour in free solution[21] where the virus has the greater mobility, demonstrating that the virus shows a greater adsorption than the host proteins. With paper chromatography, RAGETLI AND VAN DER WANT[19] found that TMV did not move from the origin in NaCl concentrations above 0.1 *M*, and in buffers of pH 3.6.

Electron microscopic examination of the U1 virus collected from the filter

* Endosmosis under the described conditions of continuous electrophoresis was confirmed by the use of dextran[5].

References p. 199.

paper has revealed a higher proportion of small rod pieces than were present in the virus as applied to the paper. The distribution of rod lengths was non-random—a number of discrete rod lengths of less than 300mμ were observed in addition to the monomer. Several of the particle sizes observed were similar to those found by SCHRAMM, SCHUMACKER AND ZILLIG[22] in studies on the degradation of TMV at high pH. These findings will be reported in detail later.

Because of the low yield of U1 after continuous electrophoresis, resulting from a high percentage of the virus remaining on the paper, it is not possible to state unequivocally whether the short rods arose through breakage of larger rods, or were seen in greater amount because of their concentration due to favourable selection by passage down the filter paper. However, the short rod length found in greatest abundance in the material collected from the paper was too prevalent to be accounted for completely in the starting material, and it is not unreasonable to presume that there is considerable breakage of Strain U1 on the paper.

Strain U2 has been examined similarly in the electron microscope. Compared with U1, much fewer short rods have been found after continuous electrophoresis, suggesting less breakage on the paper. In this regard, it should be emphasized that the infectivity per unit protein of the virus recovered after continuous electrophoresis has been investigated with Strain U2 only. Considering the apparently greater breakage of Strain U1 on the filter paper, it may not be possible to extrapolate to Strain U1 the finding obtained with Strain U2, (Table I), that the virus infectivity per unit weight of protein is not diminished by passage down the paper during continuous electrophoresis.

The soluble antigen of TMV, as purified by continuous electrophoresis, may be a closer approach to a pure protein in a non-aggregated state than preparations of antigen hitherto obtained. Judging from phosphorus content[23], ultra-violet absorption spectra[24,25], and ultra-violet absorption spectrum of material extracted from antigen with 10% perchloric acid[12], some of the antigen preparations reported may contain small amounts of nucleic acid. The ultra-violet absorption spectra presented by TAKAHASHI AND ISHII[24] and COMMONER AND YAMADA[25] have much lower $E\ \frac{280\text{m}\mu}{260\text{m}\mu}$ and $E\ \frac{280\text{m}\mu}{300\text{m}\mu}$ values than those obtained with antigen purified by continuous electrophoresis. The low $E\ \frac{280\text{m}\mu}{300\text{m}\mu}$ values suggest that the preparations contain material which is aggregated, and in fact, if corrections are made for light scattering with TAKAHASHI's data[24], the E (280mμ/260mμ) of his preparation approaches the ratio obtained with antigen purified as described in this paper.

Preparations of antigen which are apparently similar to antigen prepared in this laboratory have been obtained (after preliminary purification) by removal from a Tiselius cell[26], or by treatment at pH 10.7 and subsequent passage through columns of modified cellulose[27]. It appears that in order to obtain antigen with a high $E\ \frac{280\text{m}\mu}{260\text{m}\mu}$ some purification technique in addition to acid or salt precipitation must be

References p. 199.

employed to remove aggregated material, and possibly, nucleic acid-containing contaminants.

The ultra-violet absorption spectrum of the soluble antigen as purified by continuous electrophoresis (Fig. 3) is strikingly similar to that of the nucleic acid-free protein obtained from TMV[28]. This evidence gives strong support to the conclusion of SCHRAMM AND ZILLIG[10] that the antigen (X-protein) and the low molecular weight protein obtained upon degradation of TMV (A-protein) are identical.

Continuous electrophoresis as a direct preparative method for TMV yields a poor product when compared with TMV which is purified either chemically or centrifugally. Host proteins migrate over a wide area of the filter paper, which virtually precludes their separation from the virus. I am of the opinion that the unique contribution of continuous electrophoresis as a preparative technique for plant viruses and associated proteins lies in its use in conjunction with other physical or chemical methods, as demonstrated in the purification of the soluble antigen of TMV reported above. Frequently, existing methods such as differential centrifugation cannot in themselves enable a complete separation of virus from host constituents. This is particularly true of those plant viruses which closely approximate some host components in sedimentation behaviour. For example, with a stone-fruit tree virus isolated from cucumber, LINDNER *et al.*[29] and WILLISON *et al.*[30] found that high speed centrifugation of homogenates of tissue from infected plants resulted in a pellet which contained the virus along with some other host constituents. With continuous electrophoresis much of the contaminating substance which sediments along with the virus can be removed[31].

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank Dr. P. R. WHITFELD for examination of the soluble antigen for nucleic acid, and Miss M. BRIGGS and Mr. R. F. ADAMS of the Australian National University for the electron microscopy and moving boundary electrophoresis, respectively. Dr. N. K. BOARDMAN was an active participant in some of the studies involving the purification of the soluble antigen, and he reviewed the manuscript. Dr. J. N. PHILLIPS provided helpful discussions; Mr. B. C. MINIUS rendered valuable technical assistance.

SUMMARY

1. The technique of continuous electrophoresis as applied to a study of tobacco mosaic virus (TMV) has been described.

2. Virus isolated by differential centrifugation from plants mixedly infected with two strains of TMV has been separated into two components with this technique. The components corresponded in biological activity to the strains used to infect the plants.

3. The biological activity per unit protein of one strain (U2) was unchanged by continuous electrophoresis. The other strain was not analysed in this way.

4. TMV purified directly from leaf homogenates by continuous electrophoresis was an inferior preparation when compared with TMV purified by differential centrifugation.

5. The low molecular weight protein associated with TMV infection (soluble antigen) has been purified and was found to be similar in ultra-violet absorption spectrum to the nucleic acid-free protein obtained by the degradation of TMV.

6. The usefulness of continuous electrophoresis as a technique for the purification of plant viruses and related proteins has been discussed.

References p. 199.

REFERENCES

1 M. ZAITLIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 556.
2 A. KARLER, *Federation Proc.*, 15 (1956) 284.
3 A. SIEGEL AND S. G. WILDMAN, *Phytopathology*, 44 (1954) 277.
4 E. S. HOLDSWORTH, *Biochem. J.*, 59 (1955) 340.
5 H. G. KUNKEL AND A. TISELIUS, *J. Gen. Physiol.*, 35 (1951) 89.
6 W. P. JENCKS, M. R. JETTON AND E. L. DURRUM, *Biochem. J.*, 60 (1955) 205.
7 M. COHEN, A. SIEGEL, M. ZAITLIN, W. R. HUDSON AND S. G. WILDMAN, *Phytopathology*, in the press.
8 S. J. SINGER, J. G. BALD, S. G. WILDMAN AND R. D. OWEN, *Science*, 114 (1951) 463.
9 W. N. TAKAHASHI AND M. ISHII, *Phytopathology*, 42 (1952) 690.
10 G. SCHRAMM, AND W. ZILLIG, *Z. Naturf.*, 10b (1955) 493.
11 C. C. DELWICHE, P. NEWMARK, W. N. TAKAHASHI AND M. J. NG, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 127.
12 R. JEENER AND P. LEMOINE, *Nature*, 171 (1953) 935.
13 N. W. PIRIE, *Adv. Virus Research*, 4 (1957) 159.
14 W. GINOZA AND D. E. ATKINSON, *Virology*, 1 (1955) 253.
15 M. ZAITLIN, A. M. SCHECHTMAN, J. G. BALD AND S. G. WILDMAN, *Phytopathology*, 44 (1954) 314.
16 K. PAIGEN, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 284.
17 G. W. COCHRAN, *Phytopathology*, 37 (1947) 850.
18 R. A. GRAY, *Arch. Biochem. Biophys.*, 38 (1952) 305.
19 H. W. J. RAGETLI AND J. P. H. VAN DER WANT, *Proc. Koninkl. Nederland. Akad. Wetenschap.*, C 57 (1954) 621.
20 W. KANNGIESSER, *Naturwissenschaften*, 23 (1955) 631.
21 S. G. WILDMAN, C. C. CHEO AND J. BONNER, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 985.
22 G. SCHRAMM, G. SCHUMACKER AND W. ZILLIG, *Z. Naturf.*, 10b (1955) 481.
23 F. C. BAWDEN AND N. W. PIRIE, *J. Gen. Microbiol.*, 14 (1956) 460.
24 W. N. TAKAHASHI AND M. ISHII, *Amer. J. Botany*, 40 (1953) 85.
25 B. COMMONER AND M. YAMADA, *J. Gen. Physiol.*, 38 (1955) 459.
26 P. NEWMARK AND D. FRASER, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 1588.
27 T. Y. WANG AND B. COMMONER, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 42 (1956) 831.
28 H. FRAENKEL-CONRAT AND R. C. WILLIAMS, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 41 (1955) 690.
29 R. C. LINDNER, H. C. KIRKPATRICK AND T. E. WEEKS, *Phytopathology*, 45 (1955) 574.
30 R. S. WILLISON, M. WEINTRAUB AND J. D. FERGUSON, *Canad. J. Botany*, 34 (1956) 86.
31 M. ZAITLIN, unpublished results.

Received November 1st, 1957

SHORT COMMUNICATION

Note sur la radiochromatographie gazeuse

Depuis quelques années, la chromatographie gazeuse trouve des applications extrêmement nombreuses dans des domaines très variés de la chimie; de nombreux systèmes de détection ont été décrits dans la littérature[1,2,3].

Il nous a semblé que cette méthode chromatographique était susceptible également de rendre de grands services en radiochimie et que, dans certains cas, il était possible d'utiliser comme détecteur un compteur d'un type utilisé en physique nucléaire; ainsi l'étude des phénomènes d'échange en phase gazeuse ou liquide, la chimie des radiations pose des problèmes de séparation qui se prêtent magnifiquement à cette nouvelle technique*.

Nous avons eu l'occasion d'expérimenter la méthode dans l'étude du problème d'échange d'iode entre différents iodures d'alkyles.

Nous avons construit à cet effet un appareil de chromatographie comprenant une colonne de 1 m 20 de long, 5 mm de diamètre intérieur remplie de fire-brick (48–60 mesh) imprégné de dinonylphtalate.

La Fig. 1 montre le système d'introduction du mélange à séparer ainsi que le détecteur: ce

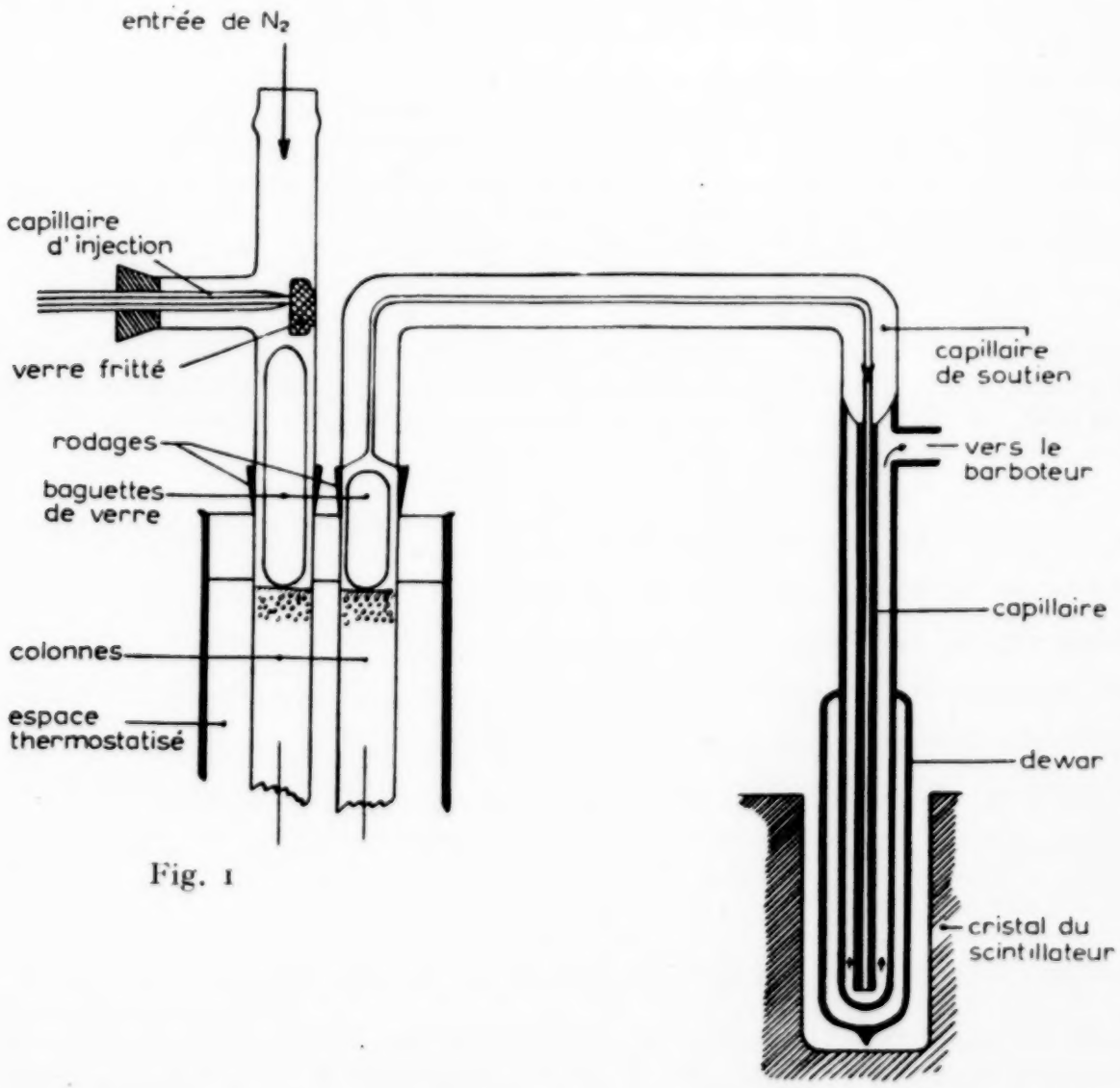


Fig. 1

dernier est constitué par un petit vase de Dewar plongé dans la cuvette d'un scintillateur γ—Tracerlab P.20 W branché sur Ratemeter, Superscaler et enregistreur Brown.

Les iodures d'alkyles ont été synthétisés au moyen de radioiode ^{131}I [(période 8 jours) β (0.6 et 0.3 MeV) γ (0.08 et 0.7 MeV)]. La Fig. 2 montre le chromatogramme enregistré à partir d'un mélange des cinq iodures d'alkyles marqués suivants:

---

* Au cours de ce travail, nous avons eu connaissance d'une publication utilisant également un appareil de radiochromatographie gazeuse: A. H. GORDUS ET J. E. WILLARD, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 4609; J. B. EVANS ET J. E. WILLARD, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 2908.

	t°C		t°C
$CH_3—CH_2I$	72.2	$(CH_3)_2CH—CH_2I$	120
$(CH_3)_2CHI$	89.5	$CH_3(CH_2)_2CH_2I$	131
$CH_3—CH_2—CH_2I$	102.4		

dans les conditions suivantes: $t = 100°$, débit de N_2: 16 ml/min.

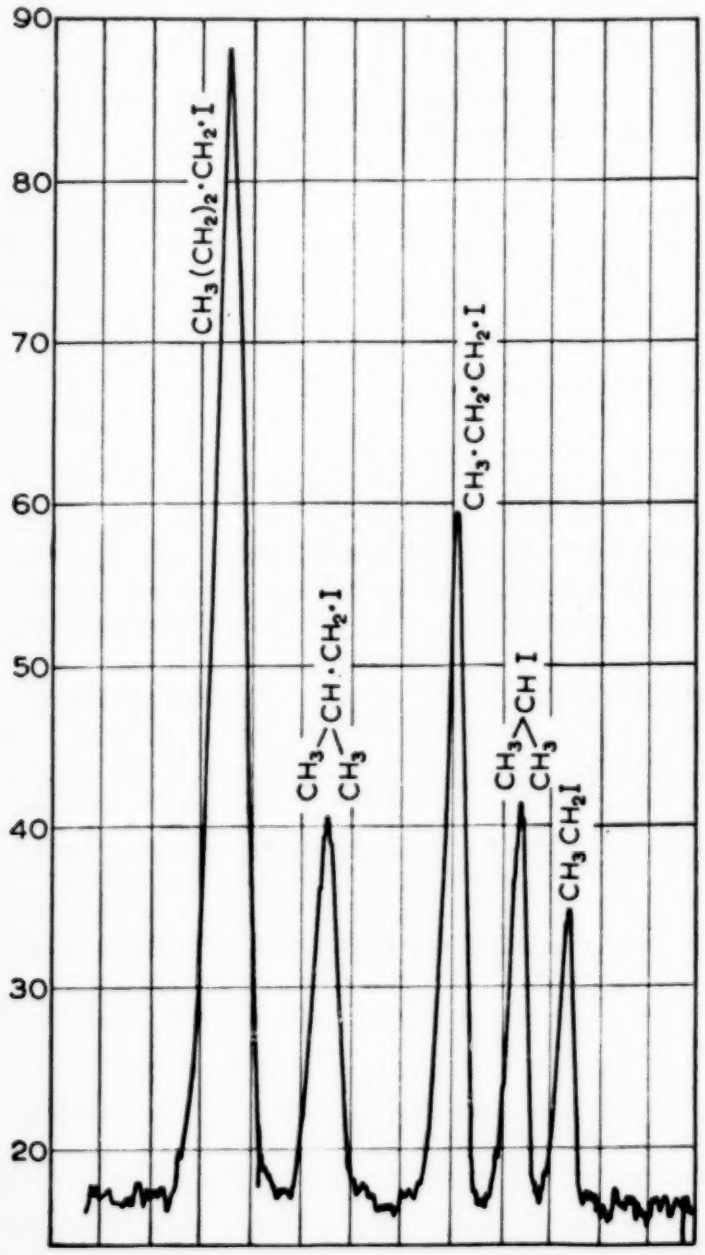


Fig. 2

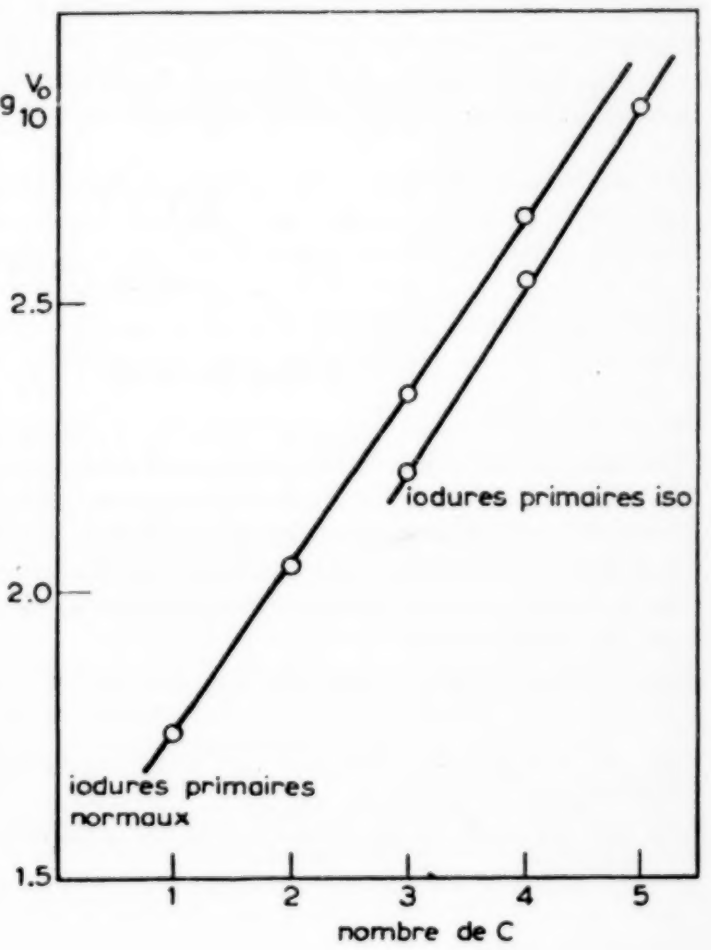


Fig. 3

On peut constater que ce détecteur simple à réaliser dans un laboratoire de radiochimie permet d'obtenir des enregistrements satisfaisants.

On peut également sa faire une opinion du fonctionnement satisfaisant de l'appareil en question en examinant le diagramme de la Fig. 3 qui constitue le test de linéarité pour une série homologue: c'est à dire la relation entre le log V_0 (volume élué) et le nombre carbone de chaque composé.

Nous utilisons cet appareil pour l'étude de la cinétique d'échange en solution dans l'acétone entre un iodure d'alkyle marqué et un ou plusieurs iodures non marqués.

Nous nous proposons également de combiner la détection thermique ordinaire avec le détecteur radioactif de façon à pouvoir connaître directement l'activité spécifique à partir des deux enregistrements.

Signalons encore que la mise au point d'un appareil de radiochromatographie gazeuse avec un détecteur en continu de ^{14}C ou T offrirait des possibilités énormes en chimie nucléaire

Nous tenons à remercier l'I.I.S.N. pour les subsides qui ont été accordés au laboratoire.

Laboratoires de Chimie analytique, Université de Liège (Belgique) C. MOUSSEBOIS
G. DUYCKAERTS

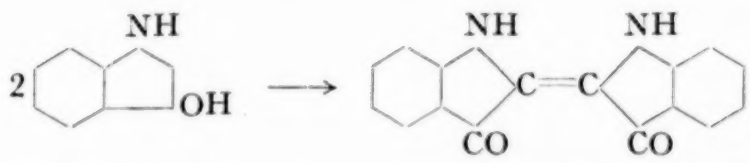
[1] A. I. M. KEULEMANS, *Gas Chromatography*, Reinhold Publishing Co., New York, 1957.
[2] D. H. DESTY, *Vapour Phase Chromatography*, Butterworth's Scientific Publ., London, 1957.
[3] C. PHILLIPS, *Gas Chromatography*, Butterworth's Scientific Publ., London, 1956.

Reçu le 27 janvier 1958

SHORT COMMUNICATION

Esterase-Nachweis auf dem Chromatogramm

Für den Direktnachweis von Fermenten auf Papier-Chromatogrammen und -Pherogrammen haben sich solche Substrate als geeignet erwiesen, die nach der Aufspaltung einen Farbstoff ergeben. Brauchbare Substrate für den Esterasenachweis sind Indoxyl-Ester. Von MUFTIC[2] wurde Indoxylbutyrat zur Bestimmung der lipolytischen Aktivitat in Pilz- und Bakterienkulturen benutzt. Dabei spielt sich folgende Reaktion ab: Nach Hydrolyse wird das Indoxyl unter aeroben Bedingungen zu Indigo-Blau oxydiert, einem Farbstoff, der wasserunlöslich ist.



3-hydroxyindol $\Delta^{2,2'}$-bipseudoindoxyl

Diese Reaktion lasst sich auch auf dem Papier durchführen. Das noch feuchte Chromatogramm wird nach der üblichen Trennung (vgl. LINSKENS[1]) mit einer 1%igen Lösung von Indoxyl-Butyrat in Aceton gleichmässig besprüht. Damit erhält es einen blass-rosa Schimmer. Das Papier wird nun unmittelbar in eine feuchte Kammer gelegt und bei 38° bebrütet. Nach ca. 48 Stunden sind sodann an den Stellen fermentativer Aktivität Streifen von Niederschlägen blauer Farbstoff-teilchen entstanden.

Botanisches Laboratorium der Universität, Nijmegen (Niederlande) H. F. LINSKENS

[1] H. F. LINSKENS, *Enzyme*, in *Papierchromatographie in der Botanik*, Springer Verl., Berlin–Göttingen–Heidelberg, 1955, S. 135–142.
[2] M. K. MUFTIC, *New medium for the detection of esterase activity of microorganisms*, *Enzymologia*, 17 (1954) 123–126.

Eingegangen den 12. Dezember 1957

BOOK REVIEWS

Gas Chromatography, by COURTENAY PHILLIPS. Butterworths Scientific Publications, London, 1957, 105 pages, price 25s.

Gas Chromatography, by A. I. M. KEULEMANS, edited by C. G. VERVER. Reinhold Publishing Corporation, New York, 1957, 217 pages, price $ 7.50.

Vapour Phase Chromatography, edited by D. H. DESTY. Butterworths Scientific Publications, London, 1957, 436 pages, price £ 3.10s.

These three books are not mutually exclusive but are complementary since the first represents a short but thorough introduction to the subject, the second a detailed discussion of work published up to 1955 (with particular reference to hydrocarbons), and the third consists of a series of papers presented at the 1956 London Conference on Gas Chromatography.

PHILLIPS' book (the shorter of the three) is suitable for newcomers to the field and for students since it does not deal at length with any aspect of the subject, but would provide a thorough grounding if carefully read.

KEULEMANS, another well known worker in the subject, gives a detailed description of both theoretical and experimental evaluations of column parameters and of solution effects. Detailed description of apparatus is not provided except for catharometer detectors. This is not surprising since at the time of writing these detectors seemed the simplest, but since then many of their defects have become apparent and now it seems that the newer ionisation monitors will replace them on the grounds of simplicity, cheapness and sensitivity. Despite this drawback all that KEULEMANS has to say will repay study.

The papers presented in the third volume fall mainly into three groups:—(1) vapour detectors *viz.* catharometers, hydrogen flare devices, the gas density meter and ionisation monitors; (2) thermodynamic treatments of solution effects and mathematic treatment of column efficiency; and (3) special applications of both gas–liquid and gas–solid chromatograms. For this reason the book is suitable only for workers having some experience or knowledge of the technique.

No major fault can be found with the production of any of the books, diagrams are clear and the indexes are adequate. Taken together these books cover all phases of the technique and all the more important published papers.

A. T. JAMES (London)

Methods of Quantitative Radiochromatography as Applied to the Study of Intermediate Metabolism, by E. B. CHAIN. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 57s.6d. (Selected Papers from the Istituto Superiore di Sanità, Rome, 1956, 5000 lire).

The volume, sold by Blackwell as a separate book, contains six papers by Prof. E. B. CHAIN, Prof. D. BOVET, and their collaborators. These papers make up Volume 1, Part II, of the selected papers of the Istituto Superiore di Sanità.

In the chromatography of radioactive substances it is relatively easy to scan a uni-dimensional chromatogram and numerous automatic instruments for this purpose have been constructed and can be bought ready made. For two-dimensional chromatography most workers resorted to radioautographs, which are simple to prepare but make quantitative evaluation rather difficult.

The first three papers of this volume describe an instrument built at the Istituto which permits quantitative scanning of two-dimensional chromatograms. Its performance is completely automatic. The chromatogram is placed on a frame, a counter-tube scans the whole paper at regular intervals and the counts per square are recorded by a typewriter on a chart. The numbers on this chart permit the localisation of radioactive spots at sight and by adding up the counts of a spot the total activity is obtained. The design of all parts of the apparatus is given in detail in numerous drawings enabling the reader to reconstruct it entirely with the data given.

The other three papers of this book are concerned with the use of this apparatus in the study of the metabolism of marked glucose and fructose in rat liver slices, the glycogen and fatty acid synthesis in perfused rat liver and the glycogen synthesis from glucose and fructose *in vivo*.

Each paper is preceded by summaries in English, Italian, French and German. Both the printing and the drawings are of the usual high standard of the publications of the Istituto Superiore di Sanità. The reviewer found very few printer's errors.

M. LEDERER (Arcueil)

NEW BOOKS

Paper Electrophoresis, by D. NACHKOV AND R. CHIPOLINI, with a foreword by A. TISELIUS. (Sofia, 1957), 200 pp., 65 illustrations, 29 tables. (In Bulgarian.)
The editor noted that names in latin characters are frequently misspelt and incomplete.

Ausgewählte Moderne Trennverfahren zur Reinigung Organischer Stoffe, by H. RÖCK. (Verlag von Dr. Dietrich Steinkopff, Darmstadt, 1957). 169 pp., 114 figures. (In German.)
Contents: 1. Allgemeines, 2. Zonenschmelzverfahren, 3. Verdrängungs-Adsorptions Chromatographie, 4. Gas-Chromatographie, 5. Thermodiffusion in flüssiger Phase.

RECEIVED
JUN 6 1958
ESSO TECHNICAL

ÜBERSICHT

CHROMATOGRAPHIE VON STERINEN, STEROIDEN UND VERWANDTEN VERBINDUNGEN

TEIL B*

R. NEHER

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel (Schweiz)

INHALTSÜBERSICHT

IV. Papierchromatographie 205
1. Allgemeine Arbeitsmethodik 206
(a) Lösungsmittelsysteme 206
(b) Papier 211
(c) Aufbringen der Substanz 213
(d) Bedingungen der Chromatographie und Apparatives 214
(e) Nachweisreaktionen, Auswertung 216
(f) Zusätzliche Methoden zur Identifizierung 224
(g) Allgemeine Trennungsschemata 225
(h) Präparative Papierchromatographie 227
(i) Quantitative Methoden 228
2. Spezielle Methoden 230
(a) Sterine 231
(b) C_{18}-Steroide (Oestrogene) 232
(c) C_{19}-Steroide (17-Ketosteroide) 233
(d) C_{21}-Steroide (Corticosteroide) 237
(e) Glykoside und Aglykone (Cardenolide, Bufadienolide) 244
(f) Saponine und Sapogenine 247
(g) Gallensäuren, Steroidcarbonsäuren 248
(h) Steroid-Konjugate 248
(i) Amino-Steroide und Steroid-Alkaloide 249
3. Chemische Struktur und chromatographisches Verhalten 249

IV. PAPIERCHROMATOGRAPHIE

Die von CONSDEN, GORDON UND MARTIN [183] im Jahre 1944 eingeführte Papierchromatographie eignete sich in ihrer ursprünglichen Form zwar ausgezeichnet für Aminosäuren, Zucker oder andere wasserlösliche Verbindungen, nicht aber für stark lipophile Stoffe wie die Sterine und Steroide. Es gelang zwar, Steroide als wasserlösliche Derivate wie z.B. Girard-Hydrazone [190] chromatographisch in Gruppen aufzutrennen, solche Methoden erwiesen sich aber für eine allgemeine Anwendung als unbrauchbar (Notwendigkeit einer chemischen Reaktion, ungenügende Auftrennung). Erst die Einführung spezieller Lösungsmittel-Systeme durch ZAFFARONI *et al.* im Jahre 1950 [191] und BUSH im Jahre 1952 [177] sowie zahlreicher Varianten davon, machte auch die Sterine und Steroide für die Papierchromatographie allgemein zugänglich. Diese Technik hat sich in den letzten Jahren dank ihrer Einfachheit und

* Für Teil A, siehe *J. Chromatog.*, 1 (1958) 122.

Literatur S. 252/258.

Wirksamkeit in ungeahntem Ausmass entwickelt und ist heute praktisch für alle Klassen von Steroiden brauchbar. Die sinnreiche Anwendung dieser Methoden hat zugleich auch die Fortschritte auf dem Steroidgebiet wesentlich gefördert, sei es auf dem Gebiet der mikrobiologischen Reaktionen, der Isolierung und Bestimmung von Hormonen, der Phytochemie, der biosynthetischen oder auch rein synthetischen Forschung und zwar nicht nur als qualitatives und quantitatives analytisches Verfahren für Mikromengen sondern auch in präparativem Masstab. Über Theorie und Praxis der Papierchromatographie im allgemeinen sei hier auf die Literatur verwiesen [2, 80, 106, 118, 182]. Die spezielle Anwendung auf Steroide ist bereits in mehreren Übersichten behandelt worden [103, 105, 150, 179, 180, 181].

Im Folgenden werden die einschlägige Literatur sowie eigene Erfahrungen über die Arbeitsmethodik diskutiert, spezielle Beispiele aus allen wichtigen Steroid-Klassen angeführt und die Zusammenhänge zwischen Konstitution und chromatographischem Verhalten untersucht.

1. Arbeitsmethodik

Im Wesentlichen handelt es sich bei der Papierchromatographie von Steroiden um eine Verteilungschromatographie und sinngemäss gilt, was hierüber bereits in Abschnitt III B 1 ausgeführt wurde. Sehr häufig spielen aber auch Adsorptionserscheinungen eine kleinere oder grössere Rolle, je nach Art des verwendeten Lösungsmittelsystems und der zu chromatographierenden Substanzen. Unerwünschte Adsorptionserscheinungen (Schwanzbildung) lassen sich weitgehend vermeiden durch Auswahl eines Systems, in dessen beiden Phasen das Substrat eine bessere Löslichkeit aufweist, was u.a. auch durch Arbeiten bei erhöhter Temperatur bewirkt werden kann.

(*a*) *Lösungsmittelsysteme*

Geeignete Systeme stehen für alle Steroidklassen meist in grosser Auswahl zur Verfügung. Die Systeme lassen sich folgendermassen einteilen (alle Verhältnisangaben in Vol/Vol):

(1) Systeme vom ZAFFARONI-Typ (meistens wasserfrei); Die Papiere werden zuerst mit stationärer Phase imprägniert, dann mit Substanz beladen und schliesslich mit der mobilen Phase versorgt. Tab. 22 gibt eine Übersicht über solche Systeme, die in geeigneter Auswahl für alle Klassen von Steroiden verwendet werden können. Beide Phasen lassen sich beliebig kombinieren, vorausgesetzt, dass sie miteinander nicht unbegrenzt mischbar sind. Einige der am häufigsten verwendeten Systeme sind z.B. Propylenglykol/Toluol, Formamid/Benzol bzw. Benzol–Chloroform und Chloroform.

(2) Systeme vom BUSH-Typ (wässrig): Man hängt die trockenen, mit Substanz beladenen Papiere in das mit mobiler und stationärer Phase gesättigte Chromatographiergefäss, lässt einige Zeit equilibrieren, wobei das Papier die polare Phase bevorzugt adsorbiert, und entwickelt dann mit der schwach polaren mobilen Phase. Tab. 23 gibt eine Übersicht über solche Systeme die sich ebenfalls für die meisten neutralen Steroide eignen, vorzugsweise bei erhöhter Temperatur (38–40°).

Literatur S. 252/258.

TABELLE 22

LÖSUNGSMITTELSYSTEME ZAFFARONI-TYP

Stationäre Phase (Imprägnierung der Papiere)	*Mobile Phase (gesättigt mit der stationären)*
Propylenglykol	Hexan, Cyclohexan
Propylenglykol–Wasser	Methylcyclohexan
Propylenglykol–Äthylenglykol	Petroläther, Ligroin
Äthylenglykol	Decalin
Cellosolve (Äthylenglykol-monoäthyläther)	Benzol, Benzol–Cyclohexan, Benzol–Chloroform
Phenylcellosolve (Äthylenglykol-monophenyläther)	Benzol–Äthylacetat, Dichlorbenzol
Carbitol (Diäthylenglykol-monoäthyläther)	Xylol, Xylol–Methyläthylketon
	Methylenchlorid
1,3-Butandiol	Chloroform
Glycerin	Chloroform–Tetrahydrofuran
Formamid	Aceton
Benzylalkohol	Methyläthylketon
Wasser	Butanol, Amylkohol

TABELLE 23

LÖSUNGSMITTELSYSTEME BUSH-TYP

Stationäre Phase	*Mobile Phase*
Methanol–Wasser	Hexan, Cyclohexan, Heptan, Isooctan, Petroläther, Benzol
tert.-Butanol–Wasser	Toluol, Isopropyläther, Äthylacetat

Häufig verwendete Systeme dieser Art sind z.B.

Bush A (Heptan–Methanol–Wasser 5:4:1)
B_5 (Benzol–Methanol–Wasser 2:1:1)
C (Toluol–Essigester–Methanol–Wasser 9:1:5:5)
E_2B (Isooctan–*tert.*-Butanol–Wasser 10:5:9)

(3) Wässrige Systeme im klassischen Sinn, ohne spezielle Imprägnierungs- oder Equilibrierungstechnik, besonders für stark polare oder ionische Steroide. Tab. 24 bis 26 geben eine Auswahl von neutralen, sauren und basischen Systemen.

TABELLE 24

WÄSSRIGE NEUTRALE LÖSUNGSMITTELSYSTEME
z.B. für Herzglykoside und Aglykone, Saponine, Sapogenine, Aminosteroide etc.

Stationäre Phase	*Mobile Phase*
Wasser	Isooctan, Ligroin
Methanol	Benzol, Toluol, Xylol
Äthanol	Chloroform
Butanol	Tetrachlorkohlenstoff
Isoamylalkohol	Butanol und höhere Alkohole
	Dioxan

Literatur S. 252/258.

TABELLE 25

WÄSSRIGE SAURE LÖSUNGSMITTELSYSTEME
z.B. für Gallensäuren, Steroidcarbonsäuren, Steroidkonjugate, Saponine, Steroidalkaloide etc.

Stationäre Phase	*Mobile Phase*
Ameisensäure–Wasser	Heptan
Essigsäure–Wasser	Toluol
Salzsäure–Wasser	Isopropyläther, Butyläther
(mit oder ohne Zusatz	Tetrachlorkohlenstoff
von Alkoholen bzw. auf	Äthylacetat
KCl-imprägniertem Papier)	Alkohole, besonders Butanol

TABELLE 26

WÄSSRIGE BASISCHE LÖSUNGSMITTELSYSTEME
z.B. für Oestrogene, Gallensäuren, Steroidcarbonsäuren, Steroidkonjugate, Saponine etc.

Stationäre Phase	*Mobile Phase*
Wasser	Benzol, Toluol, Xylol
N-Natronlauge	Chloroform
verd. Ammoniumhydroxyd	Isoamylalkohol
Äthanolamin	Pyridin, Collidin (+ NH_3)
Carbonatpuffer	
Natriumbarbituratpuffer	

TABELLE 27

SYSTEME FÜR DIE CHROMATOGRAPHIE MIT UMGEKEHRTEN PHASEN

Hydrophobierung der Cellulose mit	*Stationäre Phase*	*Mobile Phase*
Vaseline	Alkohol	Wasser [192]
Paraffinöl,	Methanol	Wasser [193]
Kerosen	Äthanol	Wasser [194]
(5–10% in Petroläther)		verd. Ammoniak [194]
	n-Propanol	Wasser [195]
		Methanol, Wasser [193]
	Cellosolve	Propanol, Methanol [193]
	Chloroform	Essigsäure [196, 197]
Petroleum	Alkohole	Wasser [198]
(10–40% in Petroläther)		
Silikon	Hexan, Benzol	Methanol, Wasser [199, 200]
(5–10% in Cyclohexan)	Cyclohexan	Äthanol, Wasser [201]
	Chloroform	Methanol, Wasser (203]
Al-Seife	Tetrachlorkohlenstoff	Methanol, Wasser [204]
Quilon	Methylcellosolve	Alkohole, Wasser [202, 205]
	Pentanol, Octanol, Dicarbonsäureester	Formamid, Wasser [248]
	Heptanol	Wasser [206, 207]

Literatur S. 252/258.

Gelegentlich werden auch monophasische Systeme benützt, wie z.B. das wasserfreie: Benzin–Chloroform–Essigsäure (100:4–40:1–4) für Sapogenine [370], wobei sich allerdings mit der Cellulose zusammen biphasische Systeme ausbilden.

(4) Systeme für die Chromatographie mit umgekehrten Phasen (reversed phase). Sie dienen für verschiedene Steroidklassen, häufig für die sehr schwach polaren. Tab. 27 gibt einen Überblick über solche Möglichkeiten, wobei die Cellulose zuerst durch verschiedene Imprägnierungen hydrophobiert werden muss, damit die schwächer polare Phase als stationäre dienen kann.

Beim Arbeiten mit all diesen Lösungsmittelsystemen ist es selbstverständlich, dass alle nicht mischbaren Phasen bei Arbeitstemperatur gegenseitig gesättigt sein müssen.

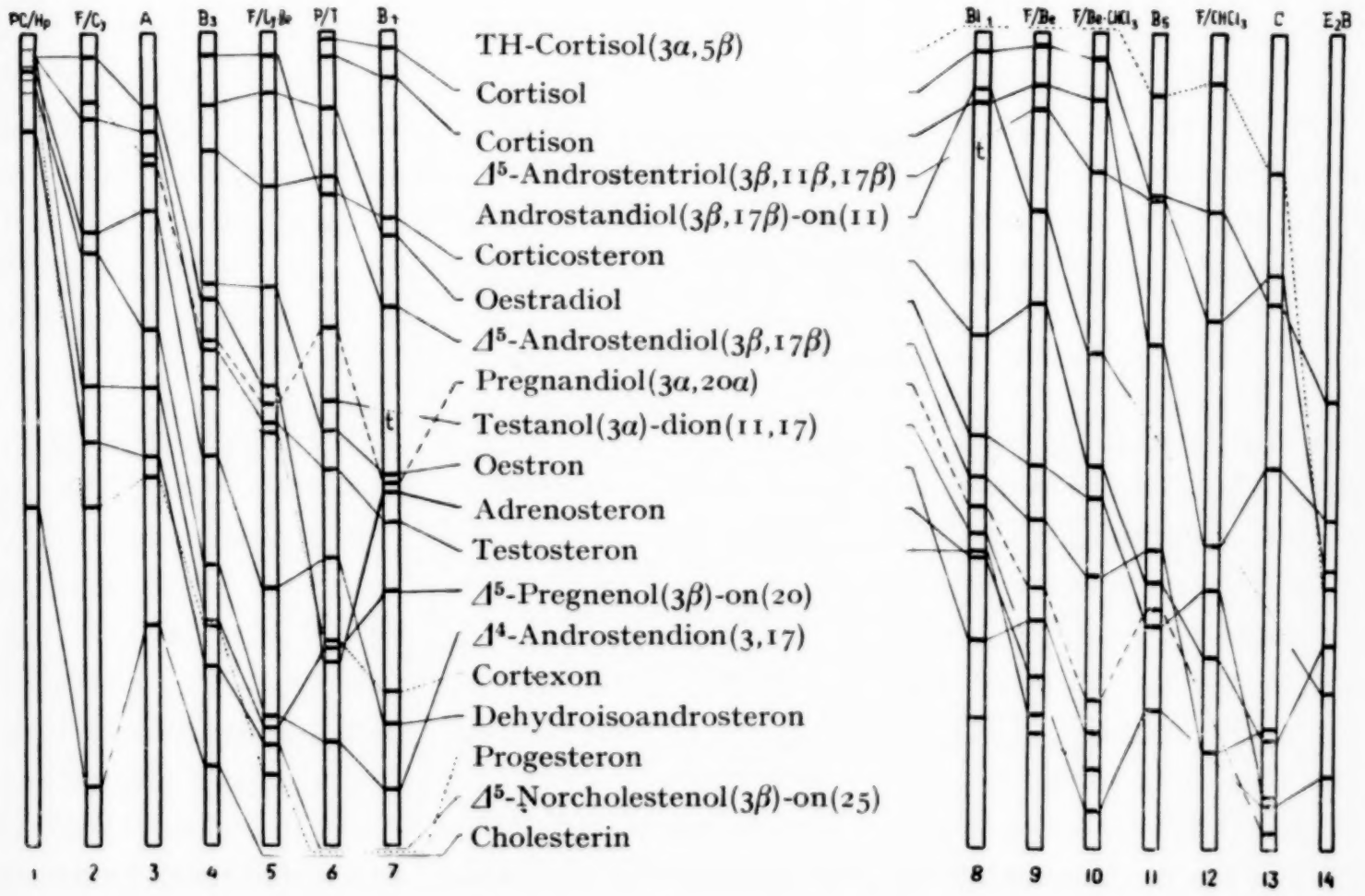


Fig. 4. Mittlere R_F-Werte von 20 Steroiden mit abnehmender Polarität von oben nach unten in 14 "Standard"-Lösungsmittelsystemen, deren Polarität von links nach rechts zunimmt (Temp. 22°, Whatman Papier No. 1, absteigend). t = tailing. 1. Phenylcellosolve/Heptan; 2. Formamid/Cyclohexan; 3. Bush A (Heptan–Methanol–Wasser 5:4:1); 4. Bush B_3 (Petroläther–Benzol–Methanol–Wasser 33:17:40:10); 5. Formamid/Cyclohexan–Benzol (1:1); 6. Propylenglykol/Toluol; 7. Bush B_1 (Petroläther–Toluol–Methanol–Wasser 5:5:7:3); 8. Petroläther–Benzol–Methanol–Wasser (3:7:5:5); 9. Formamid/Benzol; 10. Formamid/Benzol–Chloroform (1:1); 11. Bush B_5 (Benzol–Methanol–Wasser 2:1:1); 12. Formamid/Chloroform; 13. Bush C (Toluol–Äthylacetat–Methanol–Wasser 9:1:5:5); 14. Isooctan–*tert.*-Butanol–Wasser (10:5:9).

Um sich in dieser Vielfalt besser zurechtfinden zu können, sind z.B. in Fig. 4 die Laufstrecken (R_F-Werte) von 20 Steroiden (Tetrahydrocortisol bis Cholesterin) deren Polarität von oben nach unten abnimmt, in 14 bewährten "Standard"-Lösungsmittelsystemen, deren Polarität von links nach rechts zunimmt (Phenylcellosolve/Heptan bis E_2B), übersichtlich zusammengestellt. Dieses Schema erlaubt

TABELLE 28

ZAFFARONI-SYSTEME FÜR VERSCHIEDEN POLARE STEROIDE [178]

Lösungsmittelsystem	$C_{19}O_2$ $C_{21}O_2$	$C_{21}O_3$	$C_{21}O_4$	$C_{21}O_5$	$C_{21}O_6$	*21-Monoacetate* $C_{21}O_3$	$C_{21}O_4$	$C_{21}O_5$	*Diacetate* $C_{21}O_4$	$C_{21}O_5$
Formamid/Hexan	×	×				×			×	
Propylenglykol/Hexan	×	×				×			×	
Formamid/Hexan–Benzol (1:1)	×	×	×				×	×		×
Propylenglykol/Hexan–Benzol (1:1)	×	×	×				×	×		×
Formamid/Benzol		×	×	×				×		
Propylenglykol/Benzol		×	×	×				×		
Propylenglykol/Toluol		×	×	×				×		
Formamid/Chloroform			×	×	×					

TABELLE 29

BUSH-SYSTEME VERSCHIEDENER POLARITÄT [177, 181]

Petroläther–Methanol–Wasser	(100:96:4)	
Petroläther–Methanol–Wasser	(100:85:15)	
Petroläther–Methanol–Wasser	(100:80:20)	= A
Petroläther–Methanol–Wasser	(100:70:30)	
Petroläther–Toluol–Methanol–Wasser	(25:25:35:15)	= B_1
Petroläther–Toluol–Methanol–Wasser	(33::1730:20)	= B_2
Petroläther–Benzol–Methanol–Wasser	(33:17:40:10)	= B_3
Toluol–Methanol–Wasser	(100:75:25)	
Toluol–Methanol–Wasser	(100:50:50)	= B_4
Benzol–Methanol–Wasser	(100:55:45)	
Benzol–Methanol–Wasser	(100:50:50)	= B_5
Benzol–Methanol–Wasser	(100:40:60)	
Toluol–Äthylacetat–Methanol–Wasser	(90:10:50:50)	= C
Benzol–Chloroform–Methanol–Wasser	(66:33:50:50)	
Benzol–Chloroform–Methanol–Wasser	(50:50:50:50)	
Xylol–Methanol–Wasser	(100:85:15)	
Xylol–Methanol–Wasser	(100:70:30)	

u.a. die rasche Auswahl geeigneter Systeme für ein Steroid mit annährend bekannter Polarität (Anzahl der Hydroxyl- und Keto-Gruppen, Doppelbindungen). Ein weiteres Schema ist in Tab. 28 angegeben, allerdings nur für ZAFFARONI-Systeme [178]. Hingegen enthält Tab. 29 eine Auswahl von BUSH-Systemen [177, 181]. Ihre Verwendbarkeit lässt sich durch einen Vergleich mit den in Fig. 4 angeführten BUSH-Systemen sinngemäss ableiten.

Die relative Wandergeschwindigkeit (*R*-Wert) der Steroide ist in den verschiedenen Systemen, da in erster Linie von der Polarität abhängig, meistens die gleiche. Es gibt aber immer wieder Fälle, in welchen R_F-Werte durch Effekte von Adsorption, Verdrängung oder Wasserstoffbrückenbindung in einzelnen Systemen individuelle Verschiebungen erfahren, welche für die Charakterisierung von Steroiden besonders wertvoll sind. Darum ist es unbedingt empfehlenswert, sowohl ZAFFARONI- als auch BUSH-Systeme zu verwenden. Im Folgenden sei noch auf einige Unterschiede zwischen beiden Typen hingewiesen, die bei der praktischen Ausführung eine Rolle spielen:

Literatur S. 252/258.

	Lösungsmittelsysteme, Typ	
	Zaffaroni	*Bush*
Beladungskapazität	grösser	geringer
Eignung für den präparativen Chromatoblock	sehr gut	nicht möglich
Verdrängungseffekte	gelegentlich vorhanden	nicht beobachtet
Empfindlichkeit auf Temperaturschwankungen	mässig	ziemlich gross, meist erhöhte Temp. erforderlich
Trocknung der Chromatogramme	langwierig bei Raumtemperatur, sonst erhöhte Temp. erforderlich. Reste der stationären Phase schwierig aus dem Papier zu entfernen	sehr leicht bei Raumtemperatur

Wie bereits in früheren Abschnitten betont, müssen alle Lösungsmittel von hohem Reinheitsgrad und gleichbleibender Qualität sein. Zur Reinigung (Neutralwaschen, Destillieren etc.) vgl. Abschnitt III A 3. Verschiedene Lösungsmittel "Zur Chromatographie" sind im Handel erhältlich (z.B. Formamid, Merck) und können ohne weitere Reinigung verwendet werden. Alle Lösungsmittelsysteme sollen in nicht zu langen Zeitabständen immer wieder frisch bereitet werden. Chemische Veränderungen sind in gewissen Fällen möglich.

(*b*) *Papier*

Es steht eine ganze Reihe geeigneter Filterpapiere zur Verfügung. Ausser den wohl am häufigsten verwendeten Whatman No. 1 und Schleicher & Schüll 2043 b (vgl. [209]) haben sich noch viele andere Sorten für die Steroidchromatographie, teils für Spezialzwecke, als brauchbar erwiesen, wie z.B. Whatman No. 2, 3 MM, 4, 7, 31, 54, 542, Schleicher & Schüll 2040 b, 2043 a, Munktell 20, 150 G, Eaton & Dikeman 613, Durrieux 122, d'Arches 1030, Macherey & Nagel 63. Man verwendet entweder lose oder zusammenhängende Streifen, wie sie ursprünglich von ZAFFARONI *et al.* [191] angegeben wurden (vgl. auch [210, 211] und Fig. 5 u. 6) oder ganze Blätter, deren Dimensionen sich einerseits nach den Originalbögen, andererseits nach der Grösse der Chromatographiergefässe richten. Die Streifen haben den Vorteil, dass die seitliche Diffusion unterbunden ist und somit der seitliche Abstand parallel zu chromatographierender Substanzen kleiner gehalten werden kann als auf Blättern. Hingegen können bei starker Beladung der Streifen störende Randeffekte auftreten. Wir verwenden mit gutem Erfolg für analytische Chromatrogramme stets ausgestanzte Whatman 1 Streifen von 1.5 cm Breite (übrige Dimensionen s. [210] und Fig. 5) und für präparative Chromatogramme 19 cm breite Blätter mit 17 cm langer Startlinie, und zwar so, dass die Chromatographie senkrecht zur Maschinenrichtung des Papiers erfolgt. Normalerweise werden die Papiere ungewaschen zur Chromatographie verwendet. Für manche präparative Zwecke oder besonders dann, wenn Eluate von Chromatogrammen zur quantitativen Auswertung gelangen, wäscht man die Papiere vor der Chromatographie entweder mit dem nachher zu verwendenden Lösungsmittelsystem bzw. einzelnen Lösungsmitteln im Durchlauf während mehrerer Tage oder im Soxhletextraktor (vgl. z.B. [210, 212]).

Literatur S. 252/258.

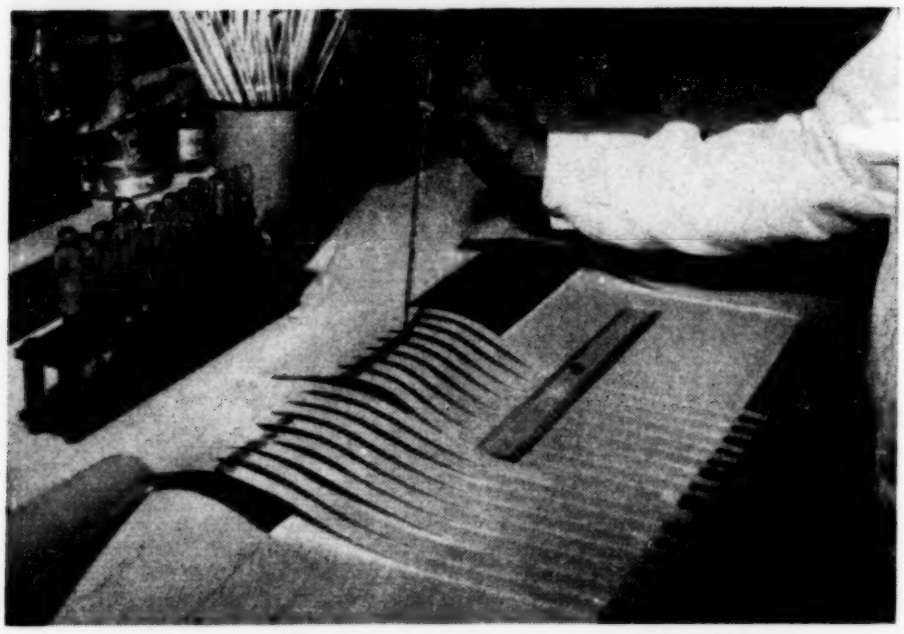


Fig. 5. Aufbringen der Substanzlösungen auf Streifen und Blätter.

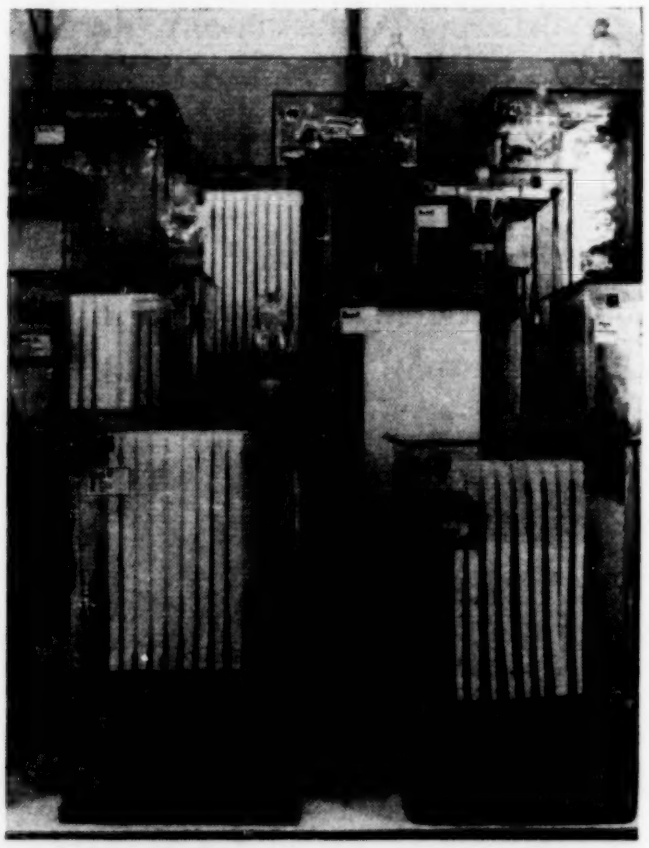


Fig. 6. Komplette Gefässe für die Papierchromatographie.

Vorbehandlung der Papiere

(1) Für die Systeme vom ZAFFARONI-Typ (Tab. 22) ist es nötig, das Papier mit der stationären Phase zu imprägnieren. Dies geschieht am einfachsten durch rasches Durchziehen der Streifen oder Blätter durch eine 20–50%ige Lösung des Imprägniermittels in Methanol, Aceton oder Chloroform. Nach 5–10 Minuten Hängen (ziemlich gleichgültig in welcher Richtung, am besten in einem Abzug) ist das flüchtige Lösungsmittel verdampft (Achtung bei sehr hoher Luftfeuchtigkeit, wegen übermässiger Kondensation von Wasser infolge der Verdampfungskälte), und das beladene Papier ist zur Aufnahme der Substanzen bereit. Letztere Operation sollte in diesem Fall nicht zuviel Zeit in Anspruch nehmen (weniger als eine halbe Stunde), da sonst auch zuviel Im-

prägniermittel abdunstet. (Volumenabnahme der stationären Phase, daher Zunahme der R_F-Werte!) Anderseits ist bei Eintauchen des Papieres in unverdünntes Imprägniermittel und nachherigem Abpressen zwischen Gummiwalzen oder Filtrierpapier meist noch soviel stationäre Phase vorhanden, dass die Substanzen bei der Chromatographie nur sehr langsam wandern. Hierbei ist auch die Struktur der Papiere zu berücksichtigen; dichte nehmen weniger stationäre Phase auf als lockere [209]. Für Chromatogramme vom ZAFFARONI-Typ verwenden wir stets 20- oder 30%ige Lösungen des Imprägniermittels in Aceton [213].

(2) Imprägnierung mit Adsorbentien. Beim Versuch, die Vorteile von Adsorption und Papierchromatographie zu vereinigen, imprägnierte man das Papier entweder mit Aluminiumoxyd [177, 214, 215] oder mit Kieselsäure [192], verlor dadurch aber gerade alle Vorteile der Verteilungschromatographie. Die Trennungen sind im allgemeinen nicht überzeugend und schwer reproduzierbar, sodass hier nicht weiter darauf eingegangen wird. (vgl. jedoch [389]).

(3) Hydrophobierung des Papieres. Der Zweck dieser Massnahme ist die Chromatographie mit umgekehrten Phasen, das heisst mit der unpolaren als stationärer und der polaren als mobiler Phase (vgl. III B 1) z.B. für extrem lipophile Steroide. Dies erreicht man am einfachsten durch Imprägnieren mit Paraffinöl, Petroleum, Vaseline oder Silikonen (vgl. Tab. 27). Silikon-imprägnierte Papiere sind übrigens im Handel erhältlich (Schleicher & Schüll 2043 a Mgl hy u. 2043 b Mgl hy). Gelegentlich sind auch höhere Alkohole, Aluminiumseifen, Quilon (Chromsäure–Stearinsäure-Komplex) oder Gummi verwendet worden; allerdings scheinen die letzteren Spezial-Systeme einen sehr beschränkten Anwendungsbereich zu haben. Eine weitere Möglichkeit der Hydrophobierung ist die Acetylierung des Papiers [216]. Dies ist ein relativ umständliches Verfahren und die acetylierten Papiere des Handels scheinen zur Zeit noch nicht befriedigend zu sein. Die meisten Trennungen auf dem Steroidgebiet, die mit Hilfe acetylierter Papiere durchgeführt werden können, sind jedoch mit weniger Aufwand auch mit gewöhnlichem Papier und geeigneten Systemen erreichbar.

(c) *Aufbringen der Substanz*

Die Substanzmenge richtet sich nach dem Zweck der Chromatographie, nach der Löslichkeit der Substanz in dem gegebenen Lösungsmittelsystem und nach der Nachweisbarkeit der Substanz auf dem Chromatogramm. Für die übliche papierchromatographische Analyse eignen sich am besten Mengen von 5–20 γ, gelöst in 5–10 μl Lösungsmittel, die mit einer Mikropipette auf den Startplatz (Durchmesser 5–15 mm) getropft werden. Bei guter Nachweisbarkeit kann man mit Mengen bis hinunter zu etwa 0.25 γ operieren, bei guter Löslichkeit bis hinauf zu etwa 1000 γ pro 1.5 cm breiten Streifen. Kleine Substanzmengen erlauben natürlich bessere Trennungen, oft ist man aber zwecks Nachweis kleiner Verunreinigungen zum Einsatz grosser Mengen gezwungen. Für präparative Chromatogramme verwendet man die gleiche Substanzmenge pro cm Startlinie wie sie sich aus analytischen Vorversuchen als optimal hinsichtlich Trennung und Beladungskapazität ergeben. Für das Auf-

tropfen der Substanzen legt man die Papiere so über eine U-förmige Holzleiste, dass die Auftropfstelle über den Hohlraum zu liegen kommt (Fig. 5).

Als Lösungsmittel für die aufzutropfenden Substanzen dienen u.a. Aceton, Chloroform, Methanol oder vorteilhaft Chloroform–Methanol (1:1). Standardlösungen bewahrt man am besten in einem nicht zu flüchtigen Lösungsmittel wie Methanol in einer Konzentration von etwa 0.2–1% in Doppelschliffgläschen (s. Fig. 5) in der Kälte und nicht länger als einige Wochen auf.

Als Mikropipetten dienen solche mit 50–100 μl Fassungsvermögen und μl-Graduierung. Für Spezialzwecke können genau geeichte Ultramikropipetten oder z.B. die Agla Mikrometersyringe verwendet werden, allerdings unter recht erheblichem Zeitaufwand. Das Auftragen für analytische Chromatogramme erfolgt am einfachsten punktförmig und für präparative strichförmig, wobei man z.B. den Inhalt einer 100 μl-Pipette über eine 17 cm-Startlinie gleichmässig auslaufen lässt. Das Anblasen der Auftropfstelle von unten mit Luft zur Beschleunigung der Trocknung ist bei Verwendung organischer Lösungsmittel normalerweise nicht erforderlich. Über eine spezielle, aber nur beschränkt anwendbare Methodik zur Auftragung grösserer Volumina vgl. [177], über eine solche mit kombinierter Vorreinigung [217]. Es empfiehlt sich meistens, parallel zu den zu analysierenden Gemischen, Fraktionen oder Substanzen bekannte Standardsubstanzen in Form von Steroiden, Farbstoffen oder anderen Verbindungen mitlaufen zu lassen, ferner einen stark lipophilen Farbstoff wie Sudan III oder IV, der mit der Lösungsmittelfront läuft und sie deutlich markiert.

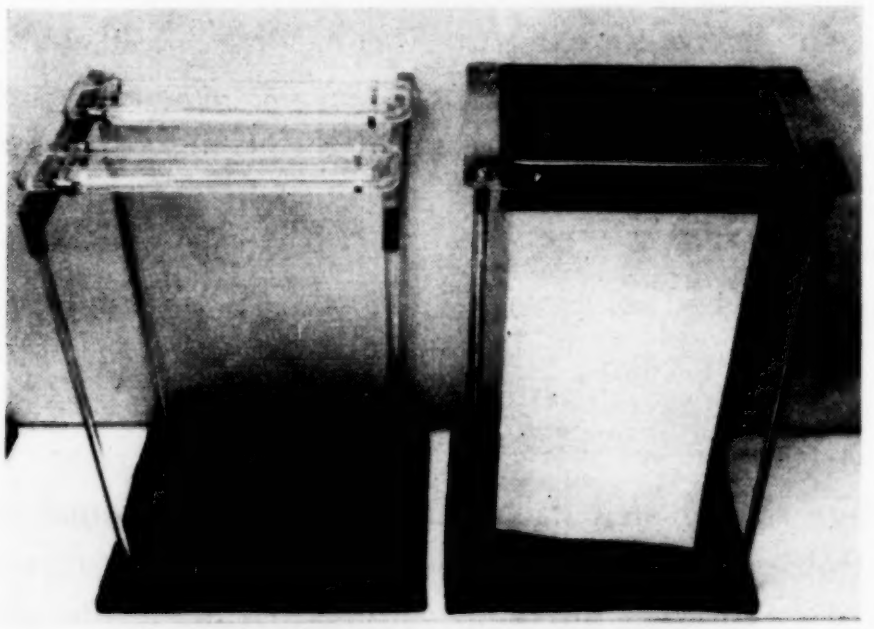


Fig. 7. Tröge aus Glas und rostfreiem Metall.

(*d*) *Bedingungen der Chromatographie und Apparatives*

Es kann auf- oder absteigend chromatographiert werden; letztere Technik ist vorteilhafter, da sie bei einem gegebenen System durch beliebige Variation der Chromatographiedauer von wenigen Stunden bis mehreren Tagen die Erreichung einer gewünschten oder notwendigen Wegstrecke erlaubt. Alle Chromatogramme sind bei möglichst konstanter Temperatur auszuführen, besonders wenn BUSH-Systeme verwendet werden. Für alle Lösungsmittelsysteme dienen die sonst bei der Papierchromato-

graphie üblichen Gefässe, die gegenüber den Lösungsmitteln resistent und dicht verschliessbar sein müssen. Sie sollen im Verhältnis zur Chromatogrammfläche kein zu grosses Volumen haben, da dies die Sättigung und Lösungsmitteldämpfen erschwert. Einwandfreie Resultate liefern z.B. die in Fig. 6 wiedergegebenen einfachen und gute Sicht gestattenden Glasgefässe (rechteckige Batteriegläser) mit geschliffenem Rand und aufgeschliffenem Glasdeckel. Silikon Hochvakuumfett dient als Dichtungsmittel. Eine ebenfalls sehr einfache Vorrichtung (Fig. 7) trägt Glas- oder Metalltröge (horizontiert!), in welche die präparierten Papierstreifen oder Blätter eingehängt werden. Die in Fig. 7 gezeigten Metalltröge aus rostfreiem Blech (mit 10 Schlitzen, [218]) haben den Vorteil, sehr platzsparend zu sein (100 Streifen oder 10 Blatt pro Trog). Bei den

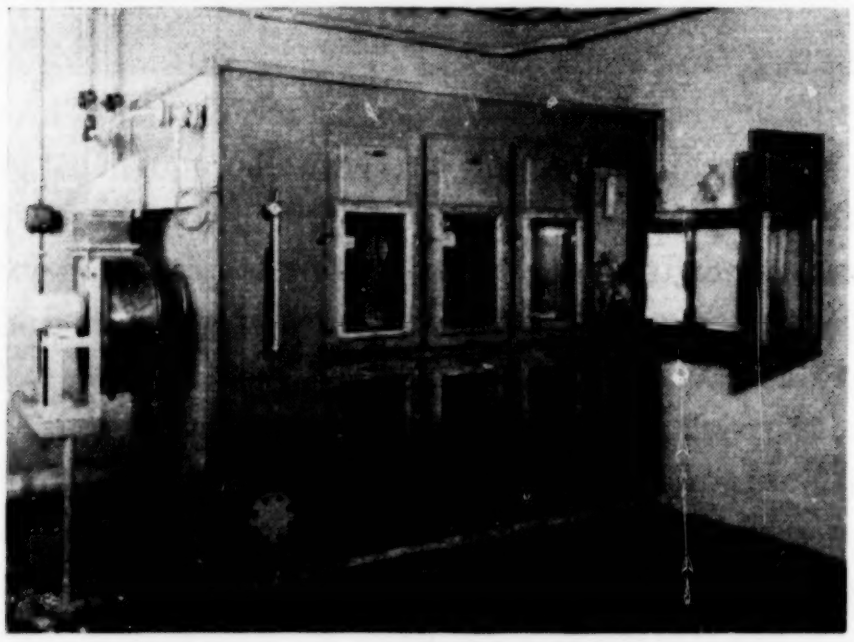


Fig. 8. Wärmeschrank mit Luftumwälzung und Schubladen.

Systemen vom BUSH-Typ werden die mit Substanzen beladenen Papiere in den trockenen Trog gehängt und im geschlossenen, mit Lösungsmitteldampf gesättigten Gefäss 6–12 Stunden equilibriert (die Dauer hängt u.a. von der Papiermenge ab); die Sättigung der Gefässe wird durch seitliche Papiere gefördert, von denen eines mit stationärer, das andere mit mobiler Phase getränkt ist. Nach der Equilibrierungsperiode lässt man durch eine Öffnung im Deckel aus einem Tropftrichter die nötige Menge mobiler Phase in den Trog einlaufen, worauf die Chromatographie beginnt. Nach 2–3 Stunden hat die Lösungsmittelfront das untere Papierende erreicht. Nach dieser oder gegebenenfalls späterer Zeit (in letzterem Fall kann man das Eluat sammeln) nimmt man das Chromatogramm heraus und hängt es zum Trocknen auf. Equilibrierung und Chromatographie haben bei der gleichen Temperatur zu erfolgen; bei Temperaturen zwischen 35 und 40° erhält man mit den BUSH-Systemen meistens kleinere und besser begrenzte Flecken und daher bessere Trennungen als bei Raumtemperatur. Für die Chromatographie bei höherer Temperatur verwendet man z.B. Brutschränke, spezielle Wärmetruhen, geheizte Räume. Hinsichtlich hygienischer und betriebssicherer Ausführung hat sich ein spezieller Schubladenschrank mit Warmluftumwälzung auch für grosse Mengen von Chromatogrammen bestens bewährt (Fig. 8 [36]).

Bei den Systemen vom ZAFFARONI-Typ wird das mit stationärer Phase und Sub-

stanzen beladene Papier direkt in den mit mobiler Phase gefüllten Trog eingeführt und die Chromatographie beginnt ohne Equilibrierungszeit in dem mit mobiler Phase gesättigten Gefäss sofort. Über eine aufsteigende Anordnung zur fraktionierten Papierchromatographie vgl. z.B. [219]. Dieses etwas umständliche Verfahren dürfte für eine allgemeine Anwendung weniger in Frage kommen.

Nach der gewünschten Zeit nimmt man die fertigen Chromatogramme aus dem Gefäss und hängt sie, vor Licht, besonders UV-Licht geschützt [220, 221], am besten in einem Abzug am unteren oder oberen Rand zum Trocknen bei Raumtemperatur auf. Unimprägnierte Papiere sind in ½ bis 1 Stunde ausreichend getrocknet, imprägnierte lässt man entweder 12–14 Stunden im schwachen Luftzug hängen oder man trocknet sie nach einer kurzen Vortrocknung an der Luft im Trockenschrank 20–40 Minuten lang bei 80–90° unter Absaugen der Dämpfe. Reste von Imprägniermitteln bleiben stets hartnäckig im Papier zurück. Während man Chromatogramme, die anschliessend mit Farbreaktionen ausgewertet werden, möglichst gut trocken soll, da Rückstände z.B. besonders von Formamid die Bildung von Farben oder Fluoreszenzen oft beeinträchtigen können, so ist dies für Chromatogramme, von welchen die Substanzen wieder eluiert werden sollen, meist nicht erforderlich; im Gegenteil, die Elution ist leichter, wenn das Papier vorher nicht völlig getrocknet wurde; das restliche Imprägniermittel lässt sich *in vitro* im Hochvakuum relativ gut entfernen. Sollte es sich ausnahmsweise um sauerstoffempfindliche Verbindungen handeln, kann man die Chromatogramme in einer heizbaren Kammer unter Durchleiten von inertem Gas trocknen [179], was jedoch meist langwierig ist.

(e) *Nachweisreaktionen und Auswertung der Chromatogramme*

Für die papierchromatographische Analyse der farblosen Steroide ist das Auffinden einer empfindlichen Nachweisreaktion ebenso wichtig wie ein gutes Lösungsmittelsystem. Glücklicherweise sind bereits eine grosse Zahl ausgezeichneter Indikatoren oder Reagentien für diesen Zweck bekannt, welche den Nachweis fast aller Steroidklassen erlauben. Es gibt zwar verschiedene Indikatoren, die spezifisch auf einzelne chemisch definierte Gruppierungen ansprechen, aber es gibt natürlich keine, die für ein oder mehrere Steroide streng spezifisch sind. Im Folgenden wird eine Zusammenstellung der für Steroide und verwandte Verbindungen brauchbaren Nachweisreaktionen gegeben. Man sollte stets daran denken, dass gelegentlich gewisse Steroide oder Vreunreinigungen ohne jegliche Behandlung auch durch Eigenfluoreszenz im UV-Licht (ca. 360 mμ) nachweisbar sein können. Für die Behandlung mit Reagenzien ziehen wir, wenn immer möglich, das Eintauchen der Chromatogramme (rasches, sorgfältiges Durchziehen durch das Reagens in flacher Schale) dem Besprühen vor.

(1) *UV-Absorption.*

(a) bei 240 mμ für Steroide mit α,β-ungesättigter Oxogruppe. Es ist sehr empfehlenswert, alle Chromatogramme mit Verdacht auf UV-absorbierende Steroide vor Ausführung von Farbreaktionen im UV zu photokopieren [46, 139, 149, 177, 222, 223, 224] oder im Fluoreszenzschirm [46, 149, 218, 224] zu prüfen. Für die Photokopie

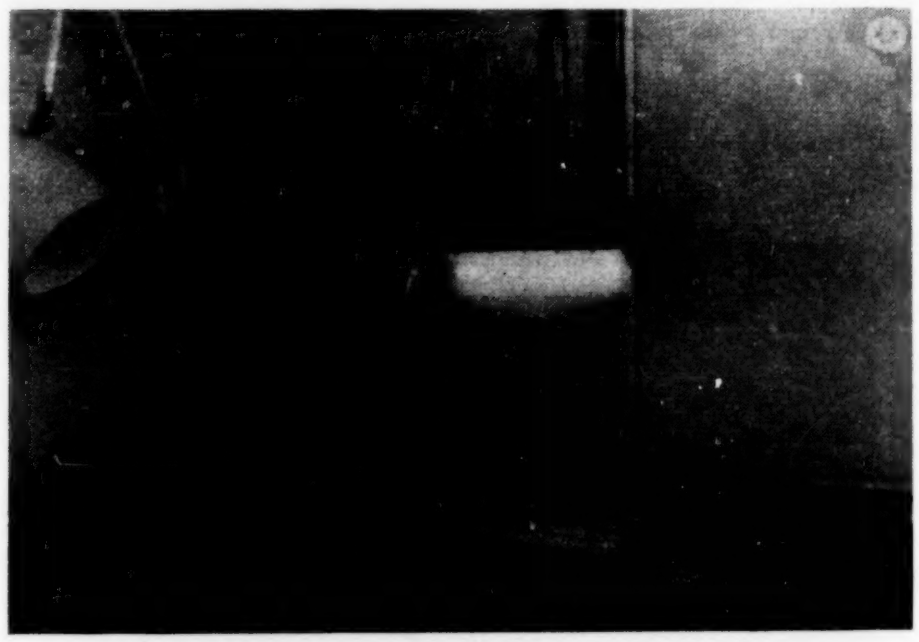


Fig. 9. Vorrichtung zur UV-Photokopie.

(Anordnung vgl. z.B. Fig. 9) dient als Lichtquelle eine keimtötende Lampe mit Hauptstrahlung bei 253.7 mμ. Das Chromatogramm wird über ein geeignetes, sehr hartes Photopapier (Kodagraph Contact Standard Paper, Ilford reflex paper No. 50, Agfa Copex C, Tellko etc.) gespannt, eventuell mit Hilfe einer Polyäthylenfolie; dann wird wenige Sekunden belichtet, entwickelt und fixiert, und der permanente Beleg zeigt nun die UV-absorbierenden Steroide als weisse Flecken oder Banden auf schwarzem Grund an (s. Fig. 10). Eine etwas kompliziertere Belichtungsvorrichtung findet sich in [222]. Die Empfindlichkeit geht etwa bis 0.5 γ α,β-ungesättigtes Ketosteroid/cm^2. Dem gleichen Zweck dient der Fluoreszenzschirm (s. Fig. 11 [218]),

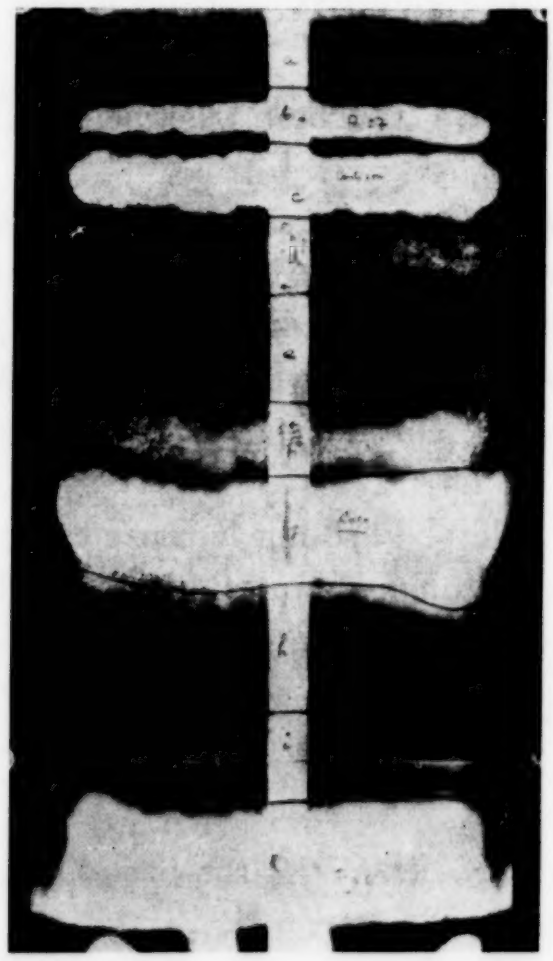


Fig. 10. UV-Photokopie eines präparativen Blattes aus dem Chromatoblock.

Literatur S. 252/258.

der anstatt des Photopapieres eine bei 253.7 mμ grün fluoreszierende Scheibe besitzt. Die auf dem zwischen Lichtquelle und Schirm liegenden Chromatogramm befindlichen UV-absorbierenden Steroide verursachen daher dunkle Stellen auf dem Schirm, die man direkt auf dem Chromatogramm von hinten anzeichnen kann.

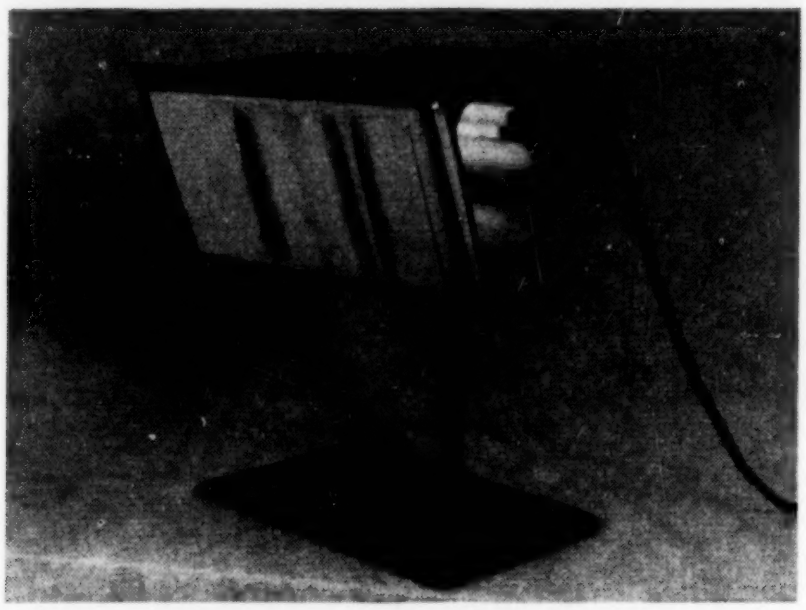


Fig. 11. Fluoreszenzschirm mit Chromatogramm.

(b) Für die UV-Photokopie bei 300–340 mμ für den Cumalinring der Scilla- und Bufo-Glykoside und Aglykone [225] verwendet man gefiltertes Licht der Quecksilberdampflampe; für diejenige bei 280 mμ für Östrogene dient z.B. Magnesiumlicht [226].

(2) m-*Dinitrobenzol (DNB) und Alkali* (Reaktion nach ZIMMERMANN bzw. RAYMOND) für 17-Ketosteroide, Herzglykoside und Aglykone (Butenolide).

(a) Durchziehen der Streifen durch eine frische Mischung gleicher Teile von (1) 3 g DNB in 190 ml Methanol + 10 ml Propylenglykol und (2) 2.5 g KOH in 20 ml Methanol + 5 ml Wasser [227].

(b) 2.5% DNB in Chloroform, tauchen, trocknen, dann Spray mit 5% KOH in Methanol [228].

(c) 10% DNB in Benzol, Spray, dann besprühen mit einer Lösung von 6 g NaOH in 25 ml Wasser und 45 ml Methanol [229].

(d) Frisch gemischte Lösung von 1 Vol. 2% DNB in Äthanol + 1 Vol. 30% KOH in Äthanol [230] oder 2 Vol. 1% DNB in Methanol + 1 Vol. 15% KOH [231].

(e) 2.5 *N*-KOH in Äthanol, eintauchen, dann in eine Lösung von 2% DNB in Äthanol tauchen, trocknen bei 65° [232].

17-Ketone geben eine violette Färbung (Grenze ca. 2–5 γ/cm^2). Andere Farben, aber viel schwächere mit 3-Ketonen (blau-blauviolett), 16-Ketonen (gelblich-braun, [230, 232]), 20-Ketonen (bräunlich-violett, [232]), intensiver wieder mit Δ^4-3,6-Diketonen (orangegelb–blaugrün–braungrün; spezifisch?) [180]. Nach Verwendung gewisser Lösungsmittelsysteme zeigen die Chromatogramme eine Tendenz zur Braunfärbung [89].

(3) *2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH)* für Steroide mit reaktiven Ketogruppen [324].

(a) Durchziehen der Streifen durch eine Lösung von 3 g DNPH in 900 ml Me-

thanol + 3 ml conc. HCl; 5 Min. trocknen bei 90°, waschen mit 2 *N*-NaOH, 2 *N*-HCl und Wasser (3 mal) [36].

(b) 300 mg in 5–6 ml Äthanol + 0.3 ml conc. H_2SO_4 erhitzen bis gelöst, verdünnen auf 200 ml mit Äthanol; Spray [150].

(c) 150 mg DNPH in 25 ml Wasser + 22 ml conc. HCl, verdünnen mit Wasser auf 100 ml [231].

(d) 1 g DNPH in 1 l Äthanol + 10 ml HCl [230].

Das DNPH-Reagens kann mit Tollens-Reagens auf ein und demselben Chromatogramm kombiniert werden [150]. Die Reihe der Empfindlichkeit ist: Δ^4-3-Ketone (2–5 γ/cm²; orange) > 3-Ketone (gelb) > 20-Ketone > 17-Ketone > $\Delta^{1,4}$-3-Ketone; α-Ketole geben sehr schlecht an, 11-Ketone überhaupt nicht [150, 232].

(4) *Silberdiammin* (Tollens Reagens) für reduzierende Steroide [190, 191, 233], Glykoside und Aglykone [234], auch α-Bromketone [150].

Eintauchen in eine frische Lösung von 10 ml 0.1 *N*-$AgNO_3$ + 10 Tropfen conc. NH_4OH + 5 ml 10% NaOH; nach maximaler Farbentwicklung spülen in einer 5% igen Lösung von $Na_2S_2O_3$ und in Wasser [191].

(5) *Tetrazoliumsalze* für reduzierende Steroide (α-Ketole).

(a) Triphenyltetrazoliumchlorid [233]: 2 Vol. 0.2% in Wasser + 1 Vol. 10% NaOH kurz vor Gebrauch mischen; spritzen oder besser eintauchen (rote Flecken).

(b) Blautetrazolium (BT) [139, 233]: Durchziehen der Chromatogramme durch eine frische Mischung von 1 Vol. 0.1% BT + 9 Vol. 2 *N*-NaOH (1–2 Tage haltbar) und Auflegen auf eine Glasplatte. Es lassen sich noch bis zu 0.2 γ Steroid mit α-Ketol-Seitenkette/cm² nachweisen (sofort blaue Flecken). Auch Ring-α-Ketole geben an, gelegentlich sogar Δ^4-3-Ketone oder Glykol-Seitenketten, wenn auch nur sehr schwach und langsam. Andere Reagens-Mischungen vgl. [235]. Die BT-Reaktion lässt sich ausgezeichnet mit der NaOH–Fluoreszenz-Reaktion kombinieren (s. diese).

(6) *Arsenmolybdat* [236] für Steroide mit α-Ketol- oder Δ^4-3-Ketogruppen (blaue Flecken). 25 g Ammonmolybdat in 450 ml Wasser + 21 ml conc. H_2SO_4 + Lösung von 3 g Na_2HAsO_4, 7 H_2O in 25 ml Wasser. 48 Stunden auf 37° erwärmen und filtrieren. Umständliche Applikation (vgl. [236]).

(7) *Natronlauge-Fluoreszenz* für Δ^4-3-Ketosteroide [177], am besten mit wässriger NaOH in Kombination mit Blautetrazolium [139, 237], wie dort beschrieben. Nach Antrocknen der benetzten Chromatogramme auf der Glasplatte bei Raumtemperatur für 30–45 Minuten werden sie bei 90° im Ofen getrocknet (15–20 Minuten, leichter Durchzug, oder durch Infrarot-Strahlung). Die Bedingungen zur Erzielung einer optimalen Fluoreszenz sind empirisch zu ermitteln. Die Reaktion ist ziemlich spezifisch für Δ^4-3-Ketosteroide (sattgelbe Fluoreszenz unter UV-Licht von ca. 360 mμ) und sehr empfindlich (Grenze *ca.* 0.1 γ/cm²). Progesteron und einige verwandte Steroide sowie 19-Nor-Steroide und 2α-Hydroxy-Steroide [238] reagieren schwächer und mehrfach konjugierte Δ^4-3-Ketone gar nicht. Auch 7-Hydroxy-Δ^4-3-Ketone reagieren nicht wegen der leichten Bildung von 3-Keto-4,6-dienen. Eine mehr oder

weniger starke Verschiebung nach grün oder blaugrün tritt mit 19-Hydroxy-Δ^4-3-Ketonen auf [68]. Δ^1-3-Ketone und α,β-ungesättigte Ketone in anderer als 3-Stellung scheinen nicht zu reagieren [181]. Eine Ausnahme bilden die gesättigten 3,6-Diketone, die eine gelbe Fluoreszenz geben, vermutlich durch Enolisierung zu Δ^4-3-Keto-6-hydroxy-Verbindungen.

(8) *Isonicotinsäurehydrazid* (*INH*) ist neuerdings als Reagens für Δ^4-3-Keto-Steroide vorgeschlagen worden [239]. Nach dem Spray mit einer Lösung von 25 mg INH in 50 ml saurem Alkohol (0.625 ml conc. HCl ad 1000 ml mit dest. Äthanol) lässt man 1 Stunde bei Raumtemperatur trocknen.

(9) *Phosphorsäure* für verschiedene Klassen besonders hydroxylgruppenhaltiger Steroide (u.a. Corticosteroide [213, 218]), Herzglykoside, Aglykone [215, 240] und Gallensäuren [240]. Man erhält lebhafte Fluoreszenzfarben wechselnder Intensität im UV-Licht (*ca.* 360 mμ; z.B. Cortisol grün bis zu 1 γ/cm^2). Meistens wird zum Eintauchen eine 20%ige wässerige Lösung verwendet [213, 218], für den Spray auch eine alkoholische [241]. Reste von Propylenglykol auf dem Chromatogramm verstärken die Farbintensitäten, solche von Formamid schwächen stark ab. Qualitativ ähnliche Fluoreszenzfarben erhält man auch mit 20%iger *p*-Toluolsulfonsäure in Äthanol [218].

(10) *Trichloressigsäure* für Pregnantriole [242], Herzglykoside und Aglykone (z.B. [228, 243, 244, 245, 246]), Sapogenine [247] und andere. Meistens als Spray verwendet:

(a) 25% in Äthanol [228, 242] oder 20–25% in Chloroform [245, 248] und 5 Minuten auf 100° erhitzen.

(b) 33% in Chloroform + 1 Tropfen H_2O_2 pro 10 ml Reagens [244].

(c) 2 Vol. 25%ige Lösung in Äthanol + 8 Vol. 3% Chloramin in Wasser, 10 Minuten 120° [228]. Man erhält meist verschiedenerlei Fluoreszenzfarben im UV-Licht (360 mμ).

(11) *Phosphomolybdänsäure* für diverse Steroide (blaue Flecken [195, 249]), Steroidsulfate und -Glukuronide [250], Oestrogene [200], Gallensäuren [251, 252], Steroidalkaloide. 2–10% in Alkohol, bei 80–100° [249, 250], oder 10% in Aceton [253]. Unterschiedliche Empfindlichkeit (1–50 γ/cm^2).

(12) *Kieselwolframsäure* für diverse Steroide [249] aber mit meist geringer Empfindlichkeit. 25% in Äthanol, Spray, Trocknen 2–5 Minuten bei 110°; verschiedene Farben.

(13) *Phosphowolframsäure* für Sterine [195, 197]: 10–15% in Äthanol.

(14) *Phenol–Molybdän–Perchlorsäure* für Δ^5-3-Hydroxy-Steroide [254]: Spray mit wassergesättigtem Phenol, Trocknen bei 20–75°; Spray mit 1 g Ammonmolybdat + 2.5 ml 60%ige Perchlorsäure in 100 ml 0.1 *N*-HCl und Erhitzen auf 75–80° für 3–8 Minuten. Rosa Farbe für Δ^5-3β-Hydroxy-Steroide; Empfindlichkeit bis *ca.* 2 γ/cm^2 (unchromatographiert).

(15) *Antimontrichlorid* für Steroide aus allen Gruppen, insbesonder Δ^5-3-

Hydroxy-Steroide [213], Sterine [193], Oestrogene [255], progesteronähnliche Steroide [256], Cardenolide [228, 248, 257, 258], Bufogenine [96], Sapogenine [259, 260], Gallensäuren [261], und diverse andere [214, 262, 263].

(a) gesättigte Lösung in Chloroform [213], eintauchen und 1–5 Minuten trocknen bei 80–90°.

(b) 25 g Antimontrichlorid in 5 ml Nitrobenzol [262], Spray und Erhitzen auf 90°.

(c) 20% in Methylenchlorid + 2% Acetylchlorid [263].

(d) Vorbehandlung der Chromatogramme in Chlorgas 20 Minuten lang, dann Spray mit einer Mischung von 38 g Antimontrichlorid und 10 ml Acetanhydrid (frisch bereiten), Erhitzen auf 90–100°; in vielen Fällen intensivere Farben oder Fluoreszenzen als ohne Chlorbehandlung [214].

(e) Gesättigte Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform + 10–20% Thionylchlorid. Spray, 3–5 Minuten 95° [198]; diese Variante soll ebenfalls intensivere Farbreaktionen liefern.

Antimontrichlorid-Reagenzien sind besonders dann vorteilhaft, wenn es sich um Verbindungen handelt, die mit den unter 1–10 angeführten Indikatoren nicht oder schlecht reagieren. Man erhält meistens im UV (360 mμ-Region) fluoreszierende Farben ganz unterschiedlicher Intensität (Feuchtigkeit schadet!).

(16) *Antimonpentachlorid* für diverse Steroidklassen wie Sterine [205, 264, 265], Oestrogene [199, 200, 266], Steroidamine [194] und andere [231, 249]: 5–50%ige Lösung in Chloroform, Eintauchen oder Spray, ev. mit nachfolgendem kurzen Erhitzen (empfindlich gegen Feuchtigkeit).

(17) *Zinkchlorid* für diverse Steroide:

(a) 30% in abs. Methanol, Spray und Erhitzen bei 130° bis zu einer Stunde [325].

(b) Spray mit einer Lösung von 20 g wasserfreiem Zinkchlorid in 30 ml Eisessig, auf 90° erhitzen. Die hierbei erhaltenen Farben oder Fluoreszenzen können teilweise bedeutend verstärkt werden durch Nachbehandlung mit einer Lösung von Benzoylchlorid–Chloroform (1:1) und Trocknen [267]; siehe auch [266].

(18) *Zinntetrachlorid* [139]: 30% in Chloroform, Eintauchen, Trocknen 20 Minuten 90°. Gibt für gewisse Steroide gute Fluoreszenzen im UV-Licht.

(19) *Jod–Kaliumjodid* gibt mit Cortison und einigen wenigen anderen Steroidverbindungen Blaufärbung [233, 266, 268]: 0.3% Jod in 5%iger wässriger Kaliumjodidlösung. Eine Nachbehandlung der besprühten Chromatogramme in Äther soll die Reaktion viel empfindlicher machen, insbesondere für oxygenierte Progesteron-Derivate [269].

(20) *Jod* [270] in Form von Dampf oder als Lösung in Petroläther gibt auch mit verschiedenen Steroiden flüchtige gelbe bis braune Flecken meist mässiger Intensität [177, 249, 271], Gallensäuren [240]. Dieses Reagens lässt sich auch in Kombination mit Perjodsäure für Steroide benützen [231].

(21) *Ferrichlorid* bzw. *Ferrichlorid-Kaliumferricyanid* für Oestrogene bzw. Enole

(blaue Flecken): 2% Ferrichlorid in abs. Methanol [266] oder viel besser eine frische Mischung aus gleichen Teilen 1% wässrig Ferrichlorid und 1% wässrig Kaliumferricyanid [272].

(22) *Aromatische Aldehyde + Säuren* für diverse Steroide, insbesondere Glykoside und Aglykone wie z.B.:

(a) Anisaldehyd–Schwefelsäure–Eisessig [213, 260, 273], weitere Literatur in [225].

(b) Dimethylaminobenzaldehyd–Schwefelsäure–Acetanhydrid [260, 271].

(c) Zimtaldehyd–Schwefelsäure–Acetanhydrid–Antimontrichlorid [275] für Saponine.

(d) Furfurol–Eisessig oder Phosphorsäure [225, 276].

(e) Vanillin–Phosphorsäure [274, 276, 277] für 17-Hydroxy-20-keto-20-methylsteroide und andere.

(f) *p*-Hydroxybenzaldehyd–Äthanol–Schwefelsäure für Sapogenine [382, 383].

(23) *3,5-Dinitrobenzoesäure* (Kedde-Reagens) für Cardenolide (blauviolette Flecken): Spray mit 1% in 0.5 *N*-KOH in Methanol–Wasser 1:1 [208] oder mit einer Mischung gleicher Vol. von 2%iger Lösung in Methanol + 2 *N*-KOH [248].

(24) *Kaliumjodwismuthat* (Kraut-Dragendorff-Reagens) und *Kaliumjodplatinat* für Girard-Derivate [190] und Steroid-Alkaloide [194, 278, 279].

(25) Sollten die genannten Reagenzien keinen Nachweis der zu analysierenden Steroide auf dem Chromatogramm erlauben, so gibt es noch weitere Möglichkeiten über welche folgende Zusammenstellung orientiert:

Reagens	*Nachweis für*
Salicyloylhydrazid (+ Indoanilintest [381])	Steroide mit reaktiven Oxogruppen
conc. od. 90%ige H_2SO_4 [122, 268, 280]	diverse Steroide
Schwefelsäure–Eisessig [213, 263]	diverse Steroide
15%ige rauchende Schwefelsäure [266]	Oestrogene
Phenylsulfonsäure–Phosphorsäure [266]	Oestrogene
Osmiumtetroxyd [281]	α,β-ungesättigte Ketone
Silbernitrat, Belichten und Entwickeln [198]	5,6-Dibromide
Phthalsäure–Zinkchlorid [282]	Oestrogene
p-Phenylendiamin-phthalat [302]	Δ^4-3-Ketosteroide
Millons Reagens [266]	Oestrogene
Bromwasser [266]	Oestrogene
Nitrose Gase–Ammoniak [284]	Oestrogene
Folin-Ciocalteu-Reagens [190, 285]	Oestrogene, reduzierende Steroide
Diazo-Reagens (Pauly) [255, 294]	phenol. Steroide, Oestrogene
Nitroprussid-Natrium (Legal-Reagens) [228, 267, 273]	Cardenolide
Pikrinsäure (Baljet-Reagens) [228, 249]	Cardenolide
p-Nitranilin [276]	Cardenolide
Jodat–Benzidin [283]	Glykoside
Permanganat [233]	div. Steroide
Permanganat–Perjodat [286]	div. Steroide, Saponine
Fluorescein (0.0005%, Kontrastverfahren) [271]	div. Steroide
Eriochromcyanin [198]	stark lipophile Sterine
Mayers Reagens ($HgCl_2$, KJ, $ZnCl_2$) [278]	Steroid-alkaloide
Fröhdes Reagens (Mo-H_2SO_4) [278]	Steroid-alkaloide
Blut (biolog. Auswertung) [247]	Sapogenine

Literatur S. 252/258.

In analoger Weise wie die Photokopien von im UV-absorbierenden Substanzen lassen sich auch von den im UV-fluoreszierenden Flecken unter Verwendung von geeigneten Filtern Photokopien oder Photographien herstellen [287, 288].

(26) *Radioautogramm.* Radioaktive Steroide oder Steroid-Derivate lassen sich auf dem Chromatogramm direkt mit dem Zählrohr feststellen [155, 289] oder durch Kontakt mit X-Film während 1 Tag bis mehreren Wochen sichtbar machen [290, 291, 292, 293].

Im einfachsten Fall liefert die Auswertung eines Papierchromatogramms 2 verschiedene Daten, die gemeinsam bereits eine beschränkte Charakterisierung oder vorläufige Identifizierung erlauben:

1. R_F-Wert $\left(\frac{\text{Distanz Start} - \text{Mittelpunkt des Fleckes}}{\text{Distanz Start} - \text{Lösungsmittelfront}}\right)$

2. Farbreaktion oder physikalische Eigenschaft.

Verschiedene Faktoren beeinträchtigen aber den Wert dieser Daten, besonders wenn man die grosse Anzahl ähnlicher Steroide berücksichtigt.

Zu 1: Trotz grosser Sorgfalt in der Durchführung der Chromatographie und möglichster Konstanthaltung der Bedingungen (wie Temperatur, Sättigung, Phasenmenge, Dauer) sind die R_F-Werte gewissen Schwankungen unterworfen. Es ist daher vorzuziehen, die Wandergeschwindigkeit einer unbekannten Substanz statt auf die Lösungsmittelfront F auf eine etwa ähnliche laufende Standardsubstanz S zu beziehen. Der so erhältliche Wert $R_S = \frac{\text{Distanz Start} - \text{Mittelpunkt des Fleckes}}{\text{Distanz Start} - \text{Substanz } S}$ weist eine viel bessere Konstanz auf mit Ausnahme von Fällen von Verdrängungseffekten und von sehr nahe beieinander laufenden Substanzen mit sehr kleinem oder sehr grossem R_S-Wert. Ausserdem lässt sich der R_S-Wert auch dann angeben, wenn die Lösungsmittelfront das Papier längst verlassen hat, was oft zur besseren Auftrennung nötig ist. Als S wird man am besten eine Substanz wählen (Steroid, Farbstoff, etc.) die unter den gegebenen Bedingungen in den mittleren Teil des Chromatogramms wandert (vgl. z.B. [150, 295]). Für eine gute chromatographische Charakterisierung ist darauf zu achten, dass die zu analysierenden Substanzen weder zu nahe dem Start noch der Lösungsmittelfront laufen. Im ersten Fall hat man länger zu chromatographieren oder ein polareres Lösungsmittel zu wählen, im letzteren ein schwächer polares. Auch unter diesen Bedingungen und unter Berücksichtigung einer Fleckenlänge von 1.5–3 cm hat man über längere Perioden mit einer gewissen Streuung der R_S-Werte zu rechnen. Handelt es sich um die papierchromatographische Charakterisierung oder Identifizierung einzelner Verbindungen oder besonders mehrerer Komponenten eines Gemisches, so wird man stets entsprechende Vergleichssubstanzen parallel mitchromatographieren lassen. Wesentlich sicherere Resultate erhält man ausserdem durch Verwendung verschiedener Lösungsmittelsysteme. Es sei an dieser Stelle noch an einige Faktoren erinnert, die die Wandergeschwindigkeit beeinflussen können, wie ungleichmässige Imprägnierung, unvollständige Sättigung der Gefässe, grössere Temperatur-

schwankungen, Höhe der Trogfüllung, Art des Einhängens der Papiere in den Trog (Saugwirkung), Dauer der Chromatographie. Bei genauen Vergleichschromatogrammen sollte man die äusserste Randzone von Blättern oder die beiden äussersten Streifen einer Serie leer lassen, da die mobile Phase gewisser Systeme in diesem Gebiet manchmal etwas hinter der Lösungsmittelfront auf dem Hauptteil zurückbleibt.

Zu 2: Qualität und Intensität vieler Farbreaktionen auf dem Chromatogramm sind ebenfalls gewissen Schwankungen unterworfen: Konzentration der Substanzen, Verunreinigungen oder Überlagerungen (Mischfarben), Ausführung der Farbreaktion (z.B. Stärke des Sprays, Erhitzungsdauer, Feuchtigkeit, Verunreinigungen in der Luft), Rückstände von Lösungsmittelsystemen (z.B. Formamid). Dies gilt besonders

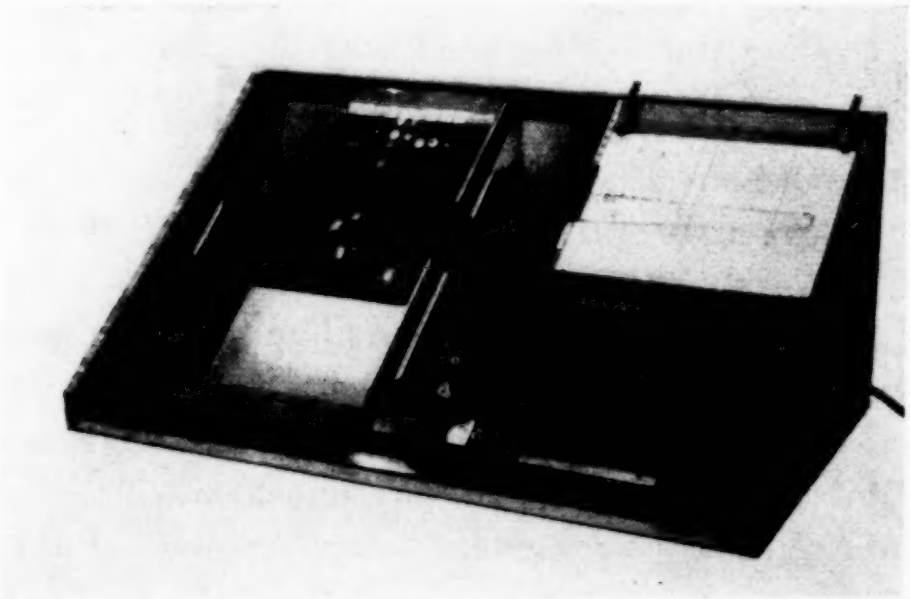


Fig. 12. Pantograph zur Auswertung von Photokopien und Chromatogrammen.

für die im UV-Licht Fluoreszenzen hervorrufenden Farbreaktionen. Man soll es sich auch hier zur Regel machen, wenn immer möglich mehr als nur eine Farbreaktion zur Charakterisierung heranzuziehen (Parallelchromatogramme).

Durch die Kombination von zwei oder mehr R_F- oder R_S-Werten *und* Farbreaktionen lassen sich die meisten Steroide ausgezeichnet charakterisieren und bis zu einem hohen Grad von Wahrscheinlichkeit mit Vergleichssubstanzen identifizieren (vgl. hierzu [150, 295]). Bei der grossen Anzahl isomerer Steroide soll jedoch nie die Möglichkeit ausser acht gelassen werden, dass sich gelegentlich zwei verschiedene Verbindungen papierchromatographisch nicht unterscheiden lassen, weshalb auch die Ausführung sogenannter Mischchromatogramme in Analogie zum Mischschmelzpunkt von geringerer Bedeutung ist. Für die Herstellung permanenter Belege erweist sich die Übertragung und Zuordnung der R_F- oder R_S-Werte und Farbreaktionen sowie eventuell UV-Absorption auf geeignete Formulare als recht nützlich, wozu R_F-Meter oder Pantograph (Fig. 12 [218]) dienen können.

(*f*) *Zusätzliche Methoden zur Identifizierung im Zusammenhang mit der Chromatographie*

(1) *Chromatographie von Derivaten.* Als sehr nützlich erweist sich die vergleichende Chromatographie von freien Steroiden und ihren Acetaten [178, 280], bzw. ihren

Oxydationsprodukten nach Behandlung mit Chromsäure [178, 180, 280, 293] oder Perjodsäure [296] in mikrochemischem Masstab, gegebenenfalls unter Benützung der Isotopenverdünnungstechnik [293]. Aus den Unterschieden in den R_F-Werten von freiem und umgesetztem Steroid (nötige Mengen 0.01–100 γ) bzw. aus dem Befund, ob überhaupt eine Reaktion stattgefunden hat, lassen sich oft wertvolle Schlüsse auf Anzahl und Stellung von Hydroxylgruppen (primär, sekundär, tertiär; vgl. auch Abschnitt IV 3) ziehen. Schwer trennbare, gesättigte und unkonjugiert ungesättigte 17-Ketosteroide lassen sich durch Behandlung mit Perbenzoesäure differenzieren, indem die letzteren in höher polare Derivate übergeführt werden und die ersteren unverändert bleiben [211]. Eine zusätzliche Identifizierung von 17-Ketosteroiden ist durch Chromatographie ihrer Zimmermann-Farbkomplexe vorgeschlagen worden [297].

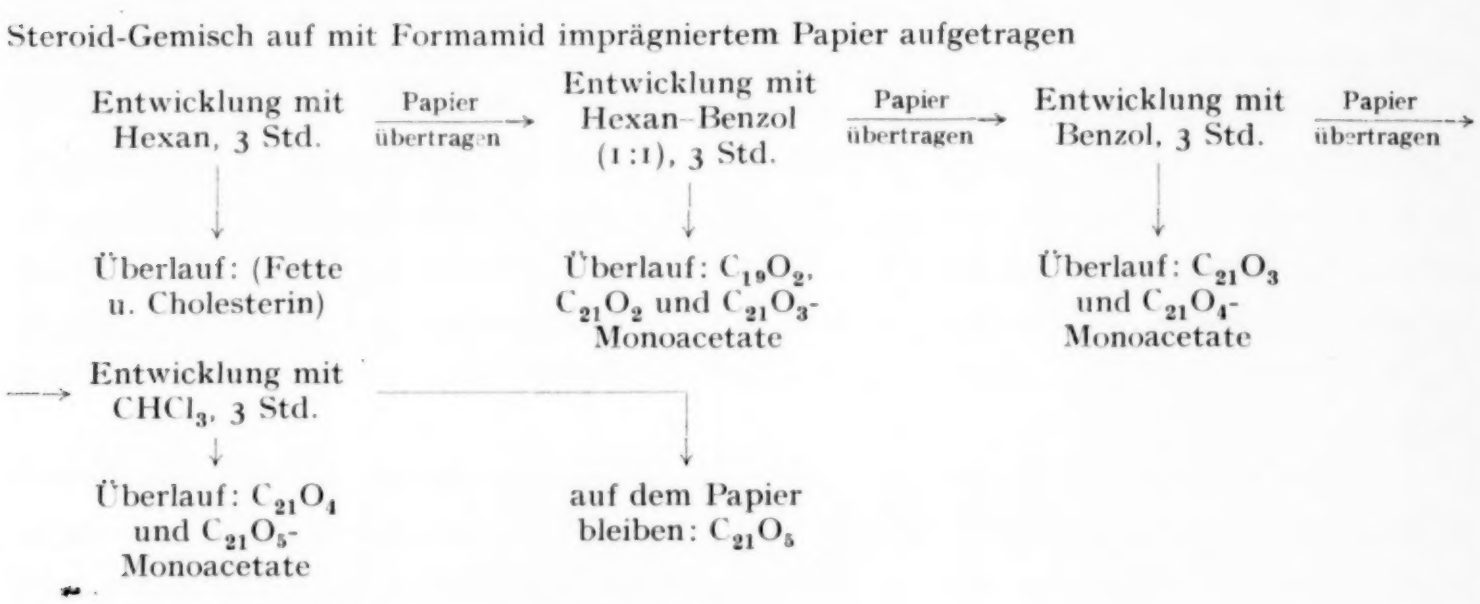
(2) *Mikrochemische Reaktionen auf dem Chromatogramm.* Unter bestimmten Bedingungen lassen sich Steroide auf dem Chromatogramm selbst oxydieren, reduzieren oder hydrolysieren, worauf die Reaktionsprodukte mit Farbreaktionen oder spektrographisch nachgewiesen werden. Durch abwechselnde Oxydation, Reduktion und Farbreaktion lässt sich die Natur der Seitenkette bei C_{21}-Steroiden einigermassen charakterisieren [298], jedoch sind Nebenreaktionen zu berücksichtigen. Alkalische Perjodsäureoxydation und folgende positive DNB-Reaktion scheint spezifisch für eine Glycerinseitenkette zu sein [299], während bei saurer Perjodsäureoxydation alle 17,20-Diole reagieren [300]. Eine Unterscheidung zwischen Dihydroxyaceton- und α-Ketolseitenkette soll durch die erhöhte Empfindlichkeit der ersteren gegenüber Alkalibehandlung vor dem Reduktionstest (auf dem Chromatogramm) möglich sein [301]. Ketale von Δ^4-3-Ketosteroiden lassen sich auf dem Papier durch Besprühen mit 50%iger wässriger Glykolsäure und 20 Minuten Erhitzen bei 90° im Trockenschrank glatt spalten, worauf die gebildeten Δ^4-3-Ketone wie üblich durch UV-Photokopie nachgewiesen werden können [81].

(3) *Spektrophotometrische Charakterisierung der Eluate.* Neben der UV-Absorption der Eluate in Alkohol (vgl. [311]) liefert diejenige in alkalischem Äthanol [303], in conc. Schwefelsäure für Steroide [178, 343, 344], Östrogene [179] oder Sapogenine [306, 307], in Phosphorsäure-Schwefelsäure [308] oder in "100%iger Phosphorsäure" [309, 310] zusätzliche Möglichkeiten für die Charakterisierung. Von den *in vitro* durchführbaren Farbreaktionen seien diejenigen mit Blautetrazolium [312, 313], Kalium-*tert.*-butylat ("soda fluorescence") [314, 315], Perchlorsäure [316], Jodtrichlorid [317] und besonders Phenylhydrazin nach PORTER-SILBER (Dihydroxyaceton-Seitenkette [318]) erwähnt. Auch die Perjodsäureoxydation lässt sich zur Charakterisierung der Seitenkette durch Abspaltung z.B. von Formaldehyd im Mikromasstab heranziehen [319] ebenso wie zur Charakterisierung des restlichen Moleküls (z.B. Bildung von 17-Ketonen, von Säuren oder eines 5-Ring-Lactones aus Aldosteron).

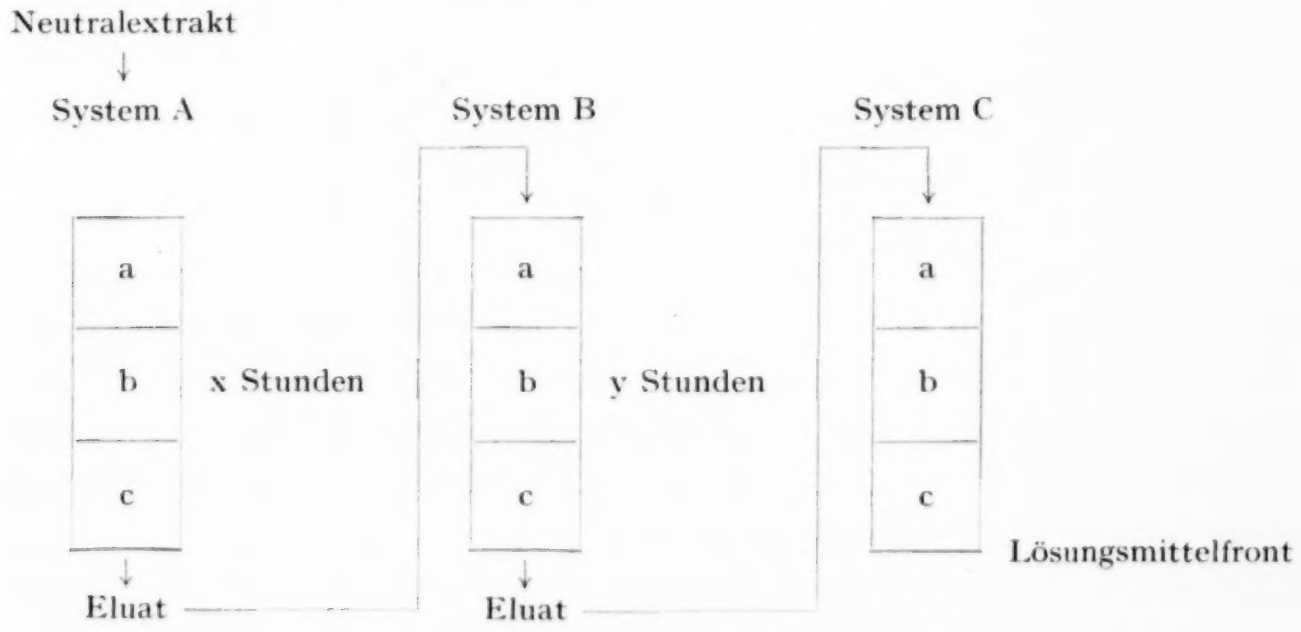
(g) *Allgemeine Trennungsschemata*

Für viele Zwecke wird es genügen, Chromatogramme in einem System oder parallel in mehreren Systemen auszuführen. Bei sehr komplizierten Mischungen wie z.B.

Harn- oder Organextrakten gelingt eine völlige Auftrennung nur durch wiederholte Chromatographie, fraktionierte Elution und Rechromatographie in anderen Systemen. Man verfährt z.B. nach folgendem Schema [178]:

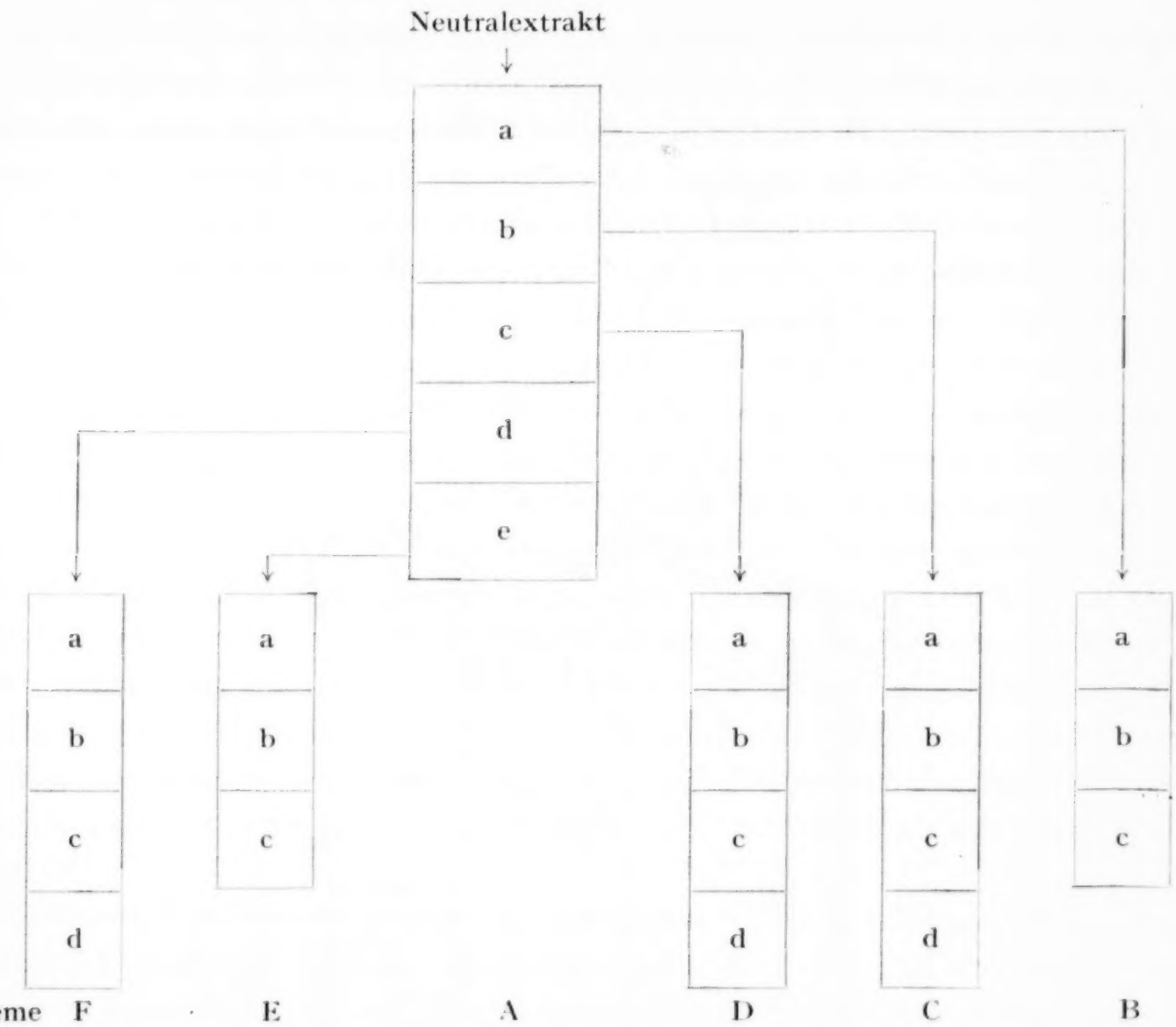

Steroid-Gemisch auf mit Formamid imprägniertem Papier aufgetragen
Entwicklung mit Hexan, 3 Std.
Papier übertragen
Entwicklung mit Hexan–Benzol (1:1), 3 Std.
Papier übertragen
Entwicklung mit Benzol, 3 Std.
Papier übertragen
Überlauf: (Fette u. Cholesterin)
Überlauf: $C_{19}O_2$, $C_{21}O_2$ und $C_{21}O_3$-Monoacetate
Überlauf: $C_{21}O_3$ und $C_{21}O_4$-Monoacetate
Entwicklung mit $CHCl_3$, 3 Std.
Überlauf: $C_{21}O_4$ und $C_{21}O_5$-Monoacetate
auf dem Papier bleiben: $C_{21}O_5$

oder auf ähnliche Weise [320, 321, 322]:



Wir ziehen im allgemeinen die auf S. *227* dargestellte Fraktionierung vor (vgl. z.B. [323]) unter Anpassung der Polarität der verschiedenen Lösungsmittelsysteme an die Polarität der Eluate aus dem 1. Chromatogramm.

In diesem Zusammenhang ist noch kurz auf die Möglichkeiten der *Elution* von Steroiden aus den Chromatogrammen hinzuweisen. Bei direkter Elution z.B. aus quer zur Chromatographie-Richtung geschnittenen Banden oder Streifen verwendet man am besten 80–100%iges Methanol oder Äthanol für höher polare Steroide, während für schwach polare Chloroform oder Methylenchlorid genügt. Es ist zu berücksichtigen, dass sich die auf der Cellulose adsorbierten Steroide in den üblichen Lösungsmitteln viel schlechter lösen als *in vitro*. Entweder überschichtet man die Papierstückchen mit dem Lösungsmittel, dekantiert und wiederholt die Prozedur [178] oder man bedient sich je nach Bedarf einer der beschriebenen speziellen Elutionsvorrichtungen [46, 149, 179, 210, 304, 305], die sich auch sehr gut für quantitative Bestimmungen eignen. Bei grösseren Mengen von Papier bewährt sich folgendes Verfahren [210]: Das



Nötigenfalls nochmalige Elution der Fraktionen aus B–F und Rechromatographie in anderen Systemen.

Papier wird mit 20%igem wässrigem Methanol oder Tetrahydrofuran zu einem dicken Brei zerstossen oder zerschlagen, nach einiger Zeit scharf abgenutscht und langsam mit reinem Methanol oder Tetrahydrofuran nachgewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingeengt und mit einem organischen Lösungsmittel zurückextrahiert.

(*h*) *Präparative Papierchromatographie*

In letzter Zeit ist die Papierchromatographie immer mehr auch in präparativem Masstab bis zu Mengen von einigen Grammen angewendet worden. Sie hat den Vorteil, dass sie sehr rasch arbeitet und nur relativ wenige, aber gut definierte Fraktionen liefert. Entweder chromatographiert man auf einer grösseren Anzahl loser Blätter [46] (z.B. im platzsparenden Schlitztrog [218]; über die Beladung vgl. Abschnitt IV 1 c) oder, wenn es sich um gewöhnliche wässrige Systeme oder solche vom ZAFFARONI-Typ handelt auf zusammengepressten Papieren. So ist z.B. die präparative Trennung von Herzglykosiden mit Erfolg auf dem Chromatopile ausgeführt worden [326]. Als besonders brauchbar hat sich für die Auftrennung komplizierter Steroidgemische verschiedener Herkunft der Chromatoblock [218] erwiesen (vgl. Fig. 13) unter Verwendung von ZAFFARONI-Systemen für Mengen bis zu 1.5 g pro Block (= Blatt). Das Chromatogramm ist bei richtiger Ausführung durch den ganzen Block hindurch bemerkenswert gleichmässig. Nach dem Trocknen der Blätter lassen sich die einzelnen,

scharf getrennten Fraktionen (Zonen) z.B. durch UV-Photokopie oder einfacher mit dem Fluoreszenzschirm (Fig. 11 [218]) erfassen, anzeichnen, ausschneiden und eluieren. In Fig. 10 ist eine UV-Photokopie eines Blattes aus einem solchen Chromato-

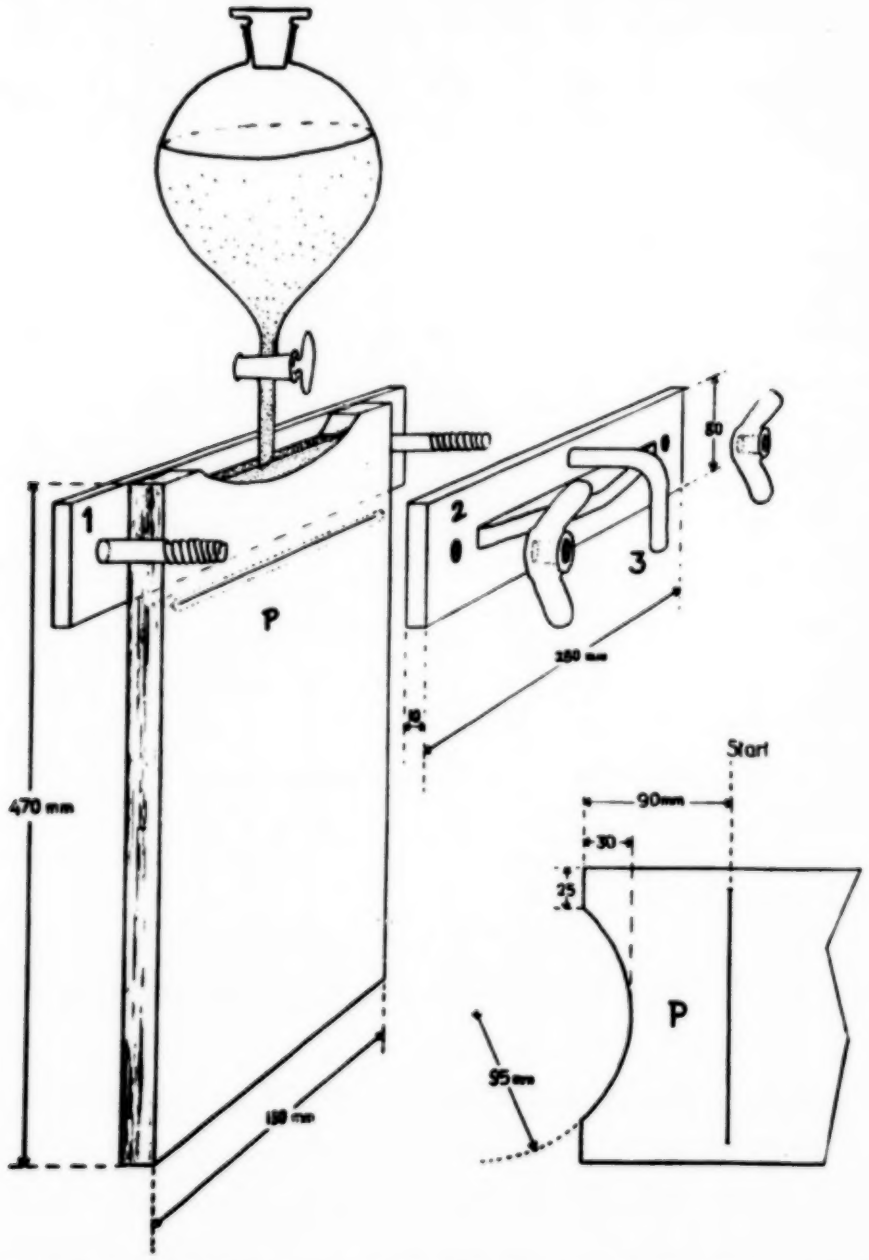


Fig. 13. Chromatoblock für die präparative Papierchromatographie.

block (Formamid/Benzol–Chloroform 1:1) wiedergegeben, wobei jedes Blatt mit 10 mg einer Nebennierenfraktion beladen wurde. Die Auftrennung ist bei der gegebenen Beladung mindestens ebenso gut wie im analytischen Chromatogramm.

(*i*) *Quantitative Methoden*

Ist die quantitative Auswertung von Papierchromatogrammen erwünscht, hat man in erster Linie den Fehler beim Auftropfen möglichst klein zu halten, mit parallel laufenden Standardkonzentrationen zu arbeiten und auf die Verwendung reiner Papiere zu achten. Im einfachsten Fall gelingt eine semiquantitative Bestimmung bei Wahl optimaler Konzentrationen (je nach der Empfindlichkeit des Indikators) durch visuellen Vergleich der Flecken (Grösse und Intensität) unbekannter Konzentration mit denjenigen von Standardsubstanzen. Vor allem eignen sich hierzu UV-Absorption, Reduktionsteste (Blautetrazolium), Natronlauge-Fluoreszenz, Phosphorsäure etc. Bei einiger Routine ist die Fehlergrenze nicht grösser als ± 20%. Vgl. die Beispiele

für die Bestimmung von Aldosteron [210], Corticosteroiden [327] oder Pregnenderivaten [150]. Trotz der relativ grossen Fehlergrenze ist diese Methode oft vorteilhaft, wenn Gemische aufzutrennen sind, von welchen eine bestimmte Komponente in sehr geringer Konzentration zu bestimmen ist, und wenn sich diese Komponente nur mit einer Farbreaktion genau auf dem Chromatogramm lokalisieren lässt. Eine Bestimmung der Konzentration aus der Fleckengrösse allein scheint in gewissen Fällen möglich [328], dürfte aber allgemein kaum anwendbar sein. Eine objektive Auswertung lässt sich entweder auf dem Papier direkt durchführen oder nach Elution der bestimmten Zone oder des entwickelten Farbfleckes *in vitro*. In geeigneten Adaptern zu Spektrophotometern misst man direkt auf dem Chromatogrammstreifen die UV-Absorption [329, 330, 331, 332] oder den blauen Farbstoff (600 mμ) nach Behandlung mit Blautetrazolium [333]. Farbflecken auf dem Chromatogramm, z.B. mit *m*-Dinitrobenzol für 17-Ketosteroide [227] oder Blautetrazolium für Corticosteroide [235] lassen sich auch mit dem Densitometer relativ gut ausmessen, nachdem das Papier transparent gemacht worden ist. Andere Vorrichtungen erlauben die Messung von UV-fluoreszierenden Flecken entweder direkt auf dem Papier (z.B. Natronlauge-Fluoreszenz von Corticosteroiden [237]) oder durch Densitometrie von Fluoreszenzphotographien, im Fall von Herzglykosiden [287] nach Behandlung mit Trichloressigsäure.

Genauere Resultate erhält man im allgemeinen, wenn man die auf den Chromatogrammen befindlichen Substanzen (Lokalisierung eventuell auf Parallelchromatogrammen) als solche eluiert und *in vitro* spektrophotometriert, sei es direkt oder nach Umsetzung mit einem Reagens, indem man gegen das Eluat eines substanzfreien Chromatogrammstückes als Blank misst (Achtung auf niedrige Blindwerte durch Verwendung gewaschener Papiere [212]). So benützt man häufig die Absorption bei 239–240 mμ für Δ^4-3-Ketosteroide (Corticosteroide etc. [150, 178, 223, 280, 304, 305]), bei 510–525 mμ nach Formazanbildung mit Blautetrazolium (für Corticosteroide [178, 305]) oder bei 526 mμ nach Reaktion mit Xanthydrol (für Cardenolide [248]). Beliebige andere Reaktionen können zur quantitativen Bestimmung herangezogen werden, wie ZIMMERMANN-Reaktion für 17-Ketosteroide [211], LIEBERMANN-BURCHARD für Cholesterin [196], conc. oder rauchende Schwefelsäure für diverse Steroide [321, 212], "Natronlauge-Fluoreszenz" für Δ^4-3-Ketosteroide [315], Umsetzung mit Hydroxylamin und Ferrichlorid zur Acetylgruppenbestimmung [178] oder Umsetzung mit weiteren, bereits in Abschnitt IV 1 f erwähnten Reagenzien. Ferner besteht eine Möglichkeit darin, dass man die Farbreaktion auf dem Chromatogramm ausführt und den gebildeten Farbstoff nach Elution *in vitro* misst. So lassen sich Formazanflecken in Pyridin-Salzsäure oder besser mit Tetrahydrofuran [334, 335] oder Essigester–Methanol (7:3) [336] vom Papier eluieren (λ max 550–560 mμ), das blaue Reaktionsprodukt von reduzierenden Steroiden mit Arsenmolybdat bereits mit Wasser ([236]; λ max 650–660 mμ). Die letzteren Methoden haben den Vorteil, dass die zu bestimmende Substanz bzw. ihr farbiges Reaktionsprodukt sehr genau aus dem Chromatogramm geschnitten werden können, während die Farbstoffbildung auf dem Papier und die Farbstoffelution Fehlerquellen in sich bergen. Im umgekehrten Fall, wenn das

unbehandelte Steroid erst eluiert und dann *in vitro* umgesetzt wird, ist zwar die Farbstoffbildung besser kontrollierbar, aber die genaue Lokalisierung der zu eluierenden Substanz bietet einige Schwierigkeiten, ausser sie lässt sich mit Hilfe von UV-Absorption, Fluoreszenz oder Radioaktivität bewerkstelligen (Achtung vor Verlusten durch UV-Bestrahlung [220, 221]). Schliesslich ist noch auf die vielversprechende quantitative Auswertung von radioaktiven Steroiden oder Steroid-Derivaten auf dem Papier oder *in vitro* hinzuweisen, die bis zu sehr niederen Konzentrationen möglich ist und unter Umständen (Doppeltracertechnik) alle Verluste auszuschalten vermag [289, 290, 291, 292, 293].

2. Spezielle Methoden

Ein allgemeiner Überblick über die Eignung von 14 ausgewählten Systemen für verschiedene Steroidklassen ist bereits weiter oben in Fig. 4 gegeben worden, wobei jeweils nur solange chromatographiert wurde bis die Lösungsmittelfront das untere Papierende erreicht hat (2.5–3 Std.). Die im oberen Teil der Chromatogramme befindlichen Substanzen lassen sich beliebig nach unten verschieben durch eine entsprechende Verlängerung der Chromatographiezeit um das 2- oder x-fache (Durchlaufchromatogramme). Dies soll als Anhaltspunkt dienen für die Ermittelung der Chromatographiedauer für Substanzen, von welchen in einigen der folgenden Tabellen lediglich der R_S-Wert angegeben ist, wobei als S z.B. Corticosteron oder Cortisol gewählt ist. Je nach diesem R_S-Wert wird man also so lange chromatographieren bis S irgendwo zwischen dem oberen und unteren Viertel der Papierlänge wandert. Wie schon erwähnt, ist bei der grossen Anzahl von Verbindungen ähnlicher Polarität auch innerhalb jeder Klasse die Unterscheidung ausser nach R_F- oder R_S-Werten in verschiedenen Systemen auch durch verschiedene Indikatoren üblich, die sich auf bestimmte funktionelle Gruppen im Steroidmolekül beziehen wie UV-Absorption, (α,β-ungesättigte Ketone), Blautetrazolium–Natronlauge (reduzierende Seitenkette oder Ringketol und Δ^4-3-Keton), ZIMMERMANN-Reaktion (vornehmlich 17-Ketone), Dinitrophenylhydrazin (reaktive Ketogruppen) etc. Dadurch können einerseits selbst gleich schnell laufende Verbindungen differenziert werden, anderseits gibt die kombinierte Auswertung gleichzeitig Hinweise auf die mögliche Konstitution unbekannter Flecken. Als Beispiel sei z.B. das Verhalten der neuerdings sehr aktuellen $\Delta^{1,4}$-3-Ketosteroide im Vergleich zu den Δ^4-3-Ketosteroiden erwähnt. Beide lassen sich durch UV-Photokopie leicht nachweisen, die gelbe Natronlaugefluoreszenz fällt aber nur mit letzteren Verbindungen positiv aus. Die in den folgenden Abschnitten tabellarisch angeführten Steroide werden daher nicht nur nach R_F- oder R_S-Werten geordnet, sondern häufig auch in Untergruppen eingeteilt, z.B. mit den Merkmalen UV + BT +, UV + BT —, UV — BT +, UV — BT — oder UV-Absorption in Kombination mit DNB- oder DNPH-*Reaktion. Im übrigen wird darauf verzichtet,

* Die hier und in den Tabellen benützten Abkürzungen haben folgende Bedeutung: UV = UV-Absorption bei 240 mμ; BT = Reduktionsvermögen mit Blautetrazolium; DNB = alkalisch *m*-Dinitrobenzol; DNPH = Dinitrophenylhydrazin; P = Propylgenglykol; F = Formamid; Tol = Toluol; Be = Benzol; Cy = Cyclohexan; A, B_{1-5}, BL_1, C und E_2B bezeichnen Systeme vom BUSH-Typ (Zusammensetzung siehe Fig. 4, S. 209); DH = Dihydro-; TH = Tetrahydro-.

Literatur S. 252/258.

sämtliche R_S- oder R_F-Werte und alle qualitativen und quantitativen Angaben über die Farbreaktionen aus der Literatur wiederzugeben, da die Bedingungen der Ausführung von Ort zu Ort erfahrungsgemäss recht verschieden sind, so dass zur eindeutigen Identifizierung doch stets Vergleichssubstanzen parallel mitchromatographiert werden müssen. Die folgenden Tabellen sollen in erster Linie anhand zahlreicher Vertreter aus allen Steroidklassen eine eingehende Orientierung über die Möglichkeiten gewähren; vgl. hierzu auch die Zusammenstellung in [150].

Alle Werte beziehen sich auf Raumtemperatur (meist 22° C) wenn nichts anderes angegeben ist und stellen Mittelwerte aus mehreren Läufen dar, wenigstens soweit es sich um eigene Angaben handelt.

(*a*) *Sterine*

Die ursprünglichen ZAFFARONI-Systeme sind für die meisten Sterine zu polar, hingegen erwies sich ein System mit Phenylcellosolve (Äthylenglykolmonophenyläther) als stationäre Phase und z.B. Heptan als mobile Phase mit Whatman No. 7 als allgemein anwendbar [267, 380]. *R*-Werte verschiedener Derivate sind in Tab. 30 wiedergegeben (aus [264]). Als Indikatoren dienen Antimontrichlorid und Antimonpentachlorid [205, 265]; ersteres gibt besonders mit Δ^5-3β-Hydroxy-Steroiden empfindliche Farbreaktionen [267]. Zur Chromatographie von ^{14}C-Cholesterin-Derivaten vgl. [291]. Für

TABELLE 30

STERINE IM SYSTEM PHENYLCELLOSOLVE/HEPTAN [264]

	R_S	$SbCl_5$ in $CHCl_3$ (20%)
Monohydroxy-Sterine	S = Cholesterin 5-stündige Entwicklung	
C_{27}-Sterine		
Cholesterin	1.0	rosa
Lathosterin	0.9	rötl.-violett
7-Dehydrocholesterin (2F)	0.7	blaugrün
Cholestanol	1.1	rosa-violett
Coprosterin	1.3	rosa
C_{28}-Sterine		
Brassicasterin (2F)	1.0	rosa
Ergosterin (3F)	0.6	blaugrün
C_{29}-Sterine		
β-Sitosterin	1.0	rosa
α-Spinasterin (2F)	0.9	grau
Stigmasterin (2F)	1.0	rosa
Di- und Tri-Hydroxy-Sterine	S = Δ^5-Cholestendiol(3β,7β) 20-stündige Entwicklung	
Δ^5-Cholestendiol(3β,7β)	1.0	blaugrün
Δ^5-Cholestendiol(3β,7α)	0.7	blaugrün
Δ^5-Cholestendiol(3β,24)	0.4	braun
Δ^5-Cholestendiol(3β,25)	0.4	braun
Δ^4-Cholestendiol(3β,6)	0.6	hellbraun
Cholestantriol(3β,5α,6β)	0.5	gelbbraun

Nach dem Spray geben Δ^7-Sterine und 7α- bzw. 7β-Hydroxyderivate sofort brillante Farben; andere erst nach kurzem Erhitzen auf 100°, die Stanole erst nach längerem Erhitzen.

Literatur S. 252/258.

Sterine ist anderseits häufig das Verfahren mit umgekehrten Phasen verwendet worden. Während sich die Hydrophobierung des Papieres mit Quilon [205] kaum durchsetzen konnte, erweist sich diejenige mit Paraffinöl als recht brauchbar, wenn Eisessig–Chloroform–Paraffinöl-Mischungen (65:25:10) als mobile Phase dienen ([196, 197]; aufsteigend, Whatman No. 3).

Die R_F-Werte betragen für

Cholesterin	0.62
Cholesterin-acetat	0.34
Cholesterin-capronat	0.16
Cholesterin-stearat u. -palmitat	0.02
Cholesterin-oleat	0.03

Diese Verbindungen wurden nach der Elution auch halbquantitativ bestimmt. Mit einem ähnlichen System ist Vitamin D und eine Reihe verwandter Verbindungen chromatographiert worden [193]: Hydrophobierung mit 5% Paraffinöl in Leichtpetrol; mobile Phase:

(a) Äthylcellosolve–*n*-Propanol–Methanol–Wasser (35:10:30:25)

(b) *n*-Propanol–Methanol–Wasser (15:82:3)

(c) 95%iges Methanol; aufsteigend, Whatman No. 2.

Indikator Antimontrichlorid. Zur Verwendung von mit Aluminium-Seife imprägniertem Papier vgl. [204] und zum Versuch einer zweidimensionalen Trennung [192], wobei für die 1. Dimension ein Kieselsäurepapier (Adsorption) und für die 2. Dimension hydrophobiertes Papier (Vaseline; Verteilung) verwendet wurde. Über neue Arbeiten in dieser Klasse s. [384, 387].

(*b*) C_{18}-*Steroide* (*Oestrogene*)

Oestrogene lassen sich ohne besondere Schwierigkeiten in den üblichen Steroidsystemen chromatographieren (vgl. Tab. 31, Systeme I, II, III), vgl. auch Tab. III in [150]. Für Oestriol wird besser ein stärker polares System verwendet als für Oestradiol und Oestron. Alle sind leicht nachweisbar, besonders mit Ferrichlorid–Kaliumferricyanid, Folin-Ciocalteu, ferner mit Antimonpentachlorid, Antimontrichlorid, Phosphorsäure, *m*-Dinitrobenzol für Oestron, Diazo-Reagens sowie andere (vgl. Nachweisreaktionen IV 1 e). Die Trennung einer ganzen Reihe von Oestrogenen ist mit den Lösungsmittelsystemen P/Methylcyclohexan, F/*o*-Dichlorbenzol, F/Cyclohexan und F/Methylenchlorid beschrieben worden [179, 266]. So liessen sich in einem oder mehreren Läufen unterscheiden: Oestriol, Oestradiol-(17*a*) und -(17*β*), Oestron, 6-Dehydro-oestron, 7-Ketooestron, Equilin, Equilenin, 17*a*-Äthinyloestradiol etc. Hierfür werden verschiedene Farbreaktionen beschrieben und eine quantitative Bestimmungsmethode durch Spektrophotometrie der Eluate bei 280–282 mμ angegeben. In einem System Benzol–Methanol–Wasser (10:8:2) erhält man bei 24° die in Tab. 31 unter V angegebenen R_F-Werte [282]. Der Nachweis erfolgt mit Phthalsäure-Zinkchlorid (gelbgrüne Fluoreszenz). Für die Chromatographie in neutralen Systemen sind noch weitere Varianten angegeben worden [285, 337 und neuerdings 379, 388]. Eine Verschiebung zu kleineren R_F-Werten erfolgt, wenn man als stationäre Phase statt Wasser eine wässrige Lösung von Lithiumchlorid oder Calciumchlorid · 2 H_2O ver-

wendet (mobile Phase Toluol–Methanol [294, 338], Tab. 31, System VI. Bei den Oestrogenen bieten sich ausserdem weitere Variationen durch Verwendung alkalischer Phasen: Man equilibriert zuerst mit beiden Phasen (stationäre: 0.5 *N*-NH_4OH, mobile: Chloroform–Benzol–*N*-NH_4OH (1:9:1)) das Whatman Papier No. 1 und entwickelt dann absteigend 2–3 Stunden [255], R_F-Werte s. Tab. 31, System VII. Über andere alkalische Systeme vgl. [284, 339]. Auch das reversed phase Verfahren ist für Oestrogene, insbesondere ihre Ester oder Äther, herangezogen worden [199, 200]; das Papier wird mit 5% Silikon (Aquatex 4040) in Cyclohexan hydrophobiert und 1 Stunde bei 110° getrocknet. Von der Mischung Wasser–Methanol–Benzol–Petroläther (2:7:3:6) verwendet man die untere Schicht als mobile Phase und die obere als stationäre, mit welcher das Gefäss gesättigt und equilibriert wird; R_F-Werte vgl. Tab. 31, System VIII. Schliesslich können Oestrogene auch in Form von Azo-Derivaten in Lösungsmittelsystemen vom BUSH-Typ getrennt werden [238, 340]; dieses Verfahren dürfte allerdings im Vergleich zu den neueren im allgemeinen nicht mehr so aktuell sein.

TABELLE 31

PAPIERCHROMATOGRAPHIE VON OESTROGENEN

	System							
	I	*II*	*III*	*IV*	*V*	*VI*	*VII*	*VIII*
Oestriol	0.00	0.00	0.05	0.05	0.18	0.00	0.02	
Oestradiol(17β)	0.36	0.93	1.40	1.29	0.68	0.27	0.78	
Oestradiol(17α)						0.45		
Oestron	2.22	1.62	2.01	1.57	0.86	0.78	0.89	
Equilin						0.65		
17α-Äthinyloestradiol						0.52		
Oestradiol(17β)-diacetat								0.42
Oestradiol(17β)-dipropionat								0.20
Oestradiol(17β)-dibenzoat								0.68
Oestronacetat								0.72

I = Propylenglykol/Toluol
II = Formamid/Benzol–$CHCl_3$ (1:1)
III = Petroläther–Benzol–Methanol–Wasser (3:7:5:5) = BL_1
IV = BL_1, 38° C
} R_S-Werte (S = Corticosteron)

V = Benzol–Methanol–Wasser (10:8:2)
VI = Toluol–Methanol–LiCl oder $CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$ in Wasser
VII = $CHCl_3$–Benzol–*N*-NH_4OH (1:9:1)
VIII = Silikonpapier, polare Phase von Wasser–Methanol–Benzol–Petroläther (2:7:3:6)
} R_F-Werte

(c) *C_{19}-Steroide (17-Ketosteroide)*

In Tab. 32–35 sind die R_S-Werte zahlreicher C_{19}-Steroide in verschiedenen Systemen wiedergegeben [36], vgl. auch Tab. III in [150]. Diese C_{19}-Steroide lassen sich zweckmässig in Gruppen verschiedener Nachweisbarkeit (alle nicht reduzierend!) einteilen, wie z.B. Δ^4-3-Ketosteroide (UV-Absorption bei 240 mμ, Natronlaugefluoreszenz),

17-Ketosteroide (DNB), Steroide ohne reaktive Ketogruppen (Antimontrichlorid, Phosphorsäure, Phosphomolybdänsäure etc.). Letztere Gruppe ist meist am schwierigsten nachweisbar, besonders solche mit 11-Ketogruppen, während Triole mit Antimontrichlorid relativ gut reagieren. Eine sehr ausführliche Studie über die Papier-

TABELLE 32

R_S-WERTE (S = CORTEXON) VON C_{19}-STEROIDEN, UV + [36]

	P/Tol	*F/Be-Cy (1:1)*	B_3	$A^{38°}$	*DNB*	*NaOH-Fluoreszenz*
Δ^4-Androstenol(11β)-dion(3,17)	0.60	0.32	0.32		+	+
Adrenosteron	1.07	0.89	0.75	0.45	+	+
Δ^4-Androstendion(3,17)	1.18	1.71	1.49	1.86	+	(+)
Testosteron	0.64	1.04	0.79	1.17	o	+
Testosteron(17α)	0.74	1.23	0.93	1.47	o	+
Testololacton	0.93	0.42	0.41	0.19	o	+
1-Dehydro-testololacton	0.67	0.21	0.16		o	o

TABELLE 33

R_S-WERTE (S = CORTEXON) VON C_{19}-STEROIDEN (UV —, DNB +) [36]

	P/Tol	*F/Be-Cy (1:1)*	B_3	$A^{38°}$	*F/Be*	*DNPH*
Androstandiol(3β,11β)-on(17)	0.14	0.20	0.08			(+)
Δ^5-Androstenol(3β)-dion(11,17)	0.50	0.45	0.32		0.76	(+)
Androstanol(3β)-dion(11,17)	0.50	0.44	0.34		0.75	(+)
Testanol(3α)-dion(11,17)	0.65	0.66	0.47	0.35		(+)
Testanol(3β)-dion(11,17)	0.67	0.75	0.50		0.91	(+)
Androstanol(3α)-dion(11,17)			0.59			(+)
Androstantrion(3,11,17)	1.22	1.31	1.12		1.14	+
Testantrion (3,11,17)	1.22	1.33	1.14	1.11	1.15	+
Dehydroepiandrosteron	0.84	1.51	0.84	1.94		(+)
Androsteron	1.01	1.79	1.35	3.12		(+)

TABELLE 34

R_S-WERTE (S = CORTICOSTERON) VON C_{19}-STEROIDEN (DNB +) [36]

	P/Tol	*F/Be*	*F/Be-$CHCl_3$ (1:1)*	$BL_1^{38°}$	*DNPH*
Δ^5-Androstendiol(3β,11β)-on(17)	0.60	1.50	1.16	1.06	(+)
Androstandiol(3β,11β)-on(17)	0.68	0.66	0.98	1.20	(+)
Testandiol(3α,11β)-on(17)	0.74			1.20	(+)
Testanol(3α)-dion(11,17)	2.30	3.30	1.79		(+)
Δ^5-Androstenol(3β)-dion(11,17)	2.34	3.20	1.67	1.40	(+)
Androstanol(3α)-dion(11,17)		3.20	1.68		(+)
Androstanol(3β)-dion(11,17)	2.39	3.23	1.69	1.40	(+)
Δ^4-Androstenol(11β)-dion(3,17)	2.42		1.42	1.54 (22°)	+, UV +
Testanol(3β)-dion(11,17)	3.06	3.80	1.80	1.48	(+)
Androstantrion(3,11,17)	5.57	4.78	1.92	1.67	+
Testantrion(3,11,17)	5.81	4.82	1.95	1.70	+

Literatur S. 252/258.

TABELLE 35

R_S-WERTE (S = CORTICOSTERON) VON C_{19}-STEROIDEN (DNB —, UV —) [36]

	P/Tol	*F/Be*	*F/Be–CHCl₃ (1:1)*	*BL₁³⁸⁰*	*DNPH*
Δ^5-Androstentriol(3β,11β,17β)	0.06	0.29	0.31	0.36	o
Androstantriol(3β,11β,17β)	0.05	0.28	0.34	0.42	o
Testantriol(3α,11β,17β)	0.06	0.35	0.39	0.51	o
Testantriol(3β,11β,17β)	0.11	0.50	0.47	tailing	o
Androstantriol(3α,11β,17β)	0.12	0.60	0.50		o
Δ^5-Androstendiol(3β,17β)-on(11)	0.16	0.74	0.73	0.69	o
Androstandiol(3β,17β)-on(11)	0.15		0.70		o
Testandiol(3α,17β)-on(11)	0.21	1.00	0.86	0.71	o
Testandiol(3β,17β)-on(11)	0.24	1.00	0.86	0.78	o
Androstandiol(3α,17β)-on(11)	0.26	1.15	0.93		o
Androstandiol(11β,17β)-on(3)	0.79	1.45	1.20	0.99	+
Testandiol(11β,17β)-on(3)	0.80	1.54	1.16	1.18	+

chromatographie von C_{19}-Steroiden stammt von SAVARD [180, 232], der besonders Propylenglykol/Ligroin als Lösungsmittel bevorzugt (50% Propylenglykol in Methanol zur Imprägnierung von Whatman No. 1). Zur Bestimmung der "relativen Wandergeschwindigkeit" (R_T-Wert) der einzelnen Ketosteroide werden Androsteron und Androstandiol(3α,11β)-on(17) als Testsubstanzen benützt, deren absolute Wandergeschwindigkeit etwa 1 cm/Std. bzw. 0.1 cm/Std. beträgt. Der R_T-Wert wird nach der Formel $R_T = \frac{\text{cm Substanz x}}{\text{cm Testsubstanz}} \cdot K$ (K = cm Testsubstanz/Std.) errechnet. Die R_T-Werte verschiedener Steroidgruppen lassen sich entsprechend Tab. 36 zusammenfassen. Wegen der hohen R_T-Werte der Gruppe I in diesem System trennt man sie besser in einem schwächer polaren Lösungsmittelsystem. In Gruppe II lassen sich die gesättigten 3,17- oder 3,20-Diketone gut von den entsprechenden Δ^4-ungesättigten unterscheiden. Isomere, die sich nur durch sterische Isomerie am C-Atom 5 unterscheiden, sind kaum trennbar. Teilweise gilt dies auch für Gruppen III und IV (s. hierzu Abschnitt IV 3). Die Analyse komplexer Steroidgemische kann man sich aber unter Umständen erleichtern, wenn man vorher die 3α- und 3β-Hydroxysteroide mittels Digitonin trennt. Bei sehr ähnlich laufenden Ketosteroiden wurden Verdrängungseffekte beobachtet. Im übrigen sei auf die Originalliteratur verwiesen.

TABELLE 36

R_T-WERTE VERSCHIEDENER STEROIDGRUPPEN NACH [180]
SYSTEM PROPYLENGLYKOL/LIGROIN

Gruppe	*Steroidgruppen*	*R_T-Werte*
I	Monoketosteroide, Monohydroxysteroide	3.0
II	Diketosteroide	1.5–3.0
III	Monohydroxy-monoketosteroide	0.2–1.5
IV	Monohydroxy-diketosteroide, Triketosteroide	0.2–1.5
V	Dihydroxy-monoketosteroide, Monohydroxy-triketosteroide, Dihydroxy-diketosteroide	0.01–0.2

Literatur S. 252/258.

Entwickelt man die mit Propylenglykol imprägnierten Papierstreifen mit Benzol–Cyclohexan (1:1) statt Ligroin [230] so scheint dies für die Trennung epimerer 17-Ketosteroide von Vorteil zu sein (vgl. auch Tab. 33 und 34). Das gleiche Lösungsmittelsystem wird zur Trennung und quantitativen Bestimmung von 17-Ketosteroiden verwendet, indem man die Chromatogramme mit alkal. *m*-Dinitrobenzollösung optimal anfärbt, durch ein Transparenzöl durchzieht und dann direkt densitometriert [227]. Auch Phenylcellosolve/Heptan und Propylenglykol/Heptan wurden für die quantitative Bestimmung von sieben 17-Ketosteroiden aus Harn verwendet [211, 221], nur werden hier die Steroide vor der Farbreaktion eluiert. Eine weitere Möglichkeit zur Trennung von C_{19}-sowie C_{21}-Steroiden (relativ schwach polare) bietet sich durch Verwendung der Systeme Formamid/Dekalin bzw. Cyclohexan, Propylenglykol/Methylcyclohexan, Butandiol/Methylcyclohexan [231]. In Verfolgung dieser Arbeiten und unter zusätzlicher Verwendung von Formamid/Methylenchlorid gelang die qualitative Identifizierung von 12 $C_{19}O_3$-Verbindungen, zur Hauptsache 17-Ketosteroide aus Harnextrakten (s. Schema der Trennung in [321]). Über die zahlreichen Farbreaktionen siehe unter Abschnitt IV 1 e. Wie bereits eingangs gezeigt wurde, eignen sich selbstverständlich auch BUSH-Systeme für die Trennung von C_{19}-Steroiden. Weitere ähnliche Beispiele sind in [341] graphisch dargestellt und in [342] angeführt. Schliesslich ist noch ein reversed phase Verfahren zu erwähnen [201], das mit silikonimprägniertem Papier (5% Dow Corning Silicone No. 1107 in Cyclohexan) und Wasser–Äthanol–Chloroform (6:10:10) als mobile Phase (polarer Anteil) arbeitet, wogegen das Gefäss mit dem unpolaren Anteil equilibriert wird. Die Trennungen scheinen befriedigend zu sein, doch dürfte keinerlei Vorteil gegenüber den oben erwähnten, einfacheren Methoden bestehen.

TABELLE 37

R_S-WERTE (S = CORTISOL) VON CORTICOSTEROIDEN (UV +, BT +) [295]

	F/Be	*P/Tol*	*F/CHCl₃*	B_5	*C*	$C^{40°}$	$E_2B^{40°}$	H_3PO_4
17*α*,19-Dihydroxy-cortexon	0.13	0.19	0.36	0.20	0.31	0.35	0.64	rot
6*β*,17*α*-Dihydroxy-cortexon	0.31	0.49	0.58	0.44	0.53	0.59	0.90	rötlich orange
6*β*-Hydroxy-corticosteron	0.30	0.66	0.50	0.31	0.35	0.40	0.41	o
19-Hydroxy-corticosteron	0.60	0.69	1.37	0.80	0.64	0.77	0.83	blau
Cortisol	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	gelbgrün
6*β*-Hydroxy-11-dehydrocorticosteron		1.87	1.62	0.91	0.70	0.75	0.49	blau
Δ^4-3-Ketopregnentriol(20,20,21)-18-säurelacton (18 → 20)		2.46	2.75	2.76	1.81	1.67	1.39	o
Cortison	1.95	2.51	2.39	1.91	1.60	1.38	1.32	bläulich
Aldosteron	1.18	2.59	2.27	1.52	1.03	0.97	0.73	o
19-Hydroxy-cortexon		4.11	2.79	2.34	1.71	1.40	1.24	o
Corticosteron			3.51		2.62			gelbgrün
11*α*, 17*α*-Dihydroxy-cortexon (*epi*-Cortisol)		0.20	0.46	0.24	0.25	0.31	0.81	grün
11*α*-Hydroxy-cortexon (*epi*-Corticosteron)		5.07	3.17	2.15	1.42	1.37	1.36	grün

Alle geben die typische gelbe Natronlauge-fluoreszenz mit Ausnahme von 17*α*,19-Dihydroxy-cortexon (blaugrün), 19-Hydroxy-corticosteron (gelb-grünlich) u. 19-Hydroxy-cortexon (blaugrün).

Literatur S. 252/258.

TABELLE 38

R_S-WERTE (S = CORTISOL) VON CORTICOSTEROIDEN (UV —, BT +) [295]

	P/Tol	*F/CHCl₃*	R_S	*C*	$C^{40°}$	$E_2B^{40°}$	H_3PO_4
Allo-TH-Cortisol (3β,5α)	0.20	0.22	0.33	0.42	0.57	1.12	violett-orange
TH-Cortisol (3α,5β)	0.29	0.28	0.38	0.52	0.63	1.51	violett-orange
Allo-TH-Cortisol (3α,5α)	0.40	0.40	0.55	0.65	0.82	1.37	gelblich-lila
Allo-TH-Cortison (3β,5α)	0.40	0.79	0.70	0.60	0.77	1.78	hellblau
TH-Cortison (3α,5β)	0.42	1.01	0.89	0.81	0.88	1.92	blau
Allopregnantriol(3β,17α,21)-on(20)	2.34	2.50	2.87	2.02	1.63	2.51	rotviolett
Allo-DH-Cortisol (5α)	2.67	1.61	1.86	1.58	1.43	1.40	orange-lila
DH-Cortisol (5β)	2.70	1.43	1.99	1.63	1.51	1.49	orange-lila
Pregnantriol(3α,17α,21)-on(20)	2.80	2.79	2.81	1.99	1.81	2.71	o
Allo-TH-Corticosteron (3β,5α)	4.00	2.63	2.64	1.87	1.67	1.61	(blau-violett)
DH-Cortison (5β)	5.31	2.84	2.83	2.04	1.73	1.66	blau
TH-Corticosteron (3α,5β)	5.43	2.60	3.24	2.21	2.01	1.62	o
Allo-DH-Cortison (5α)	5.47	3.11	2.80	2.07	1.71	1.60	blau
Allo-TH-11-Dehydrocorticosteron (3β,5α)	> 6.00	3.71	3.19	2.23	1.74	1.52	o
TH-11-Dehydrocorticosteron (3α,5β)	> 6.00	3.75	3.71	2.28	1.92	2.18	o

(*d*) C_{21}-*Steroide* (*Corticosteroide*)

Neben den Herzglykosiden ist es diese Klasse von Steroiden, die von der Einführung geeigneter Lösungsmittelsysteme ab 1950 [191] vermutlich am meisten profitiert hat. Aus den Tabellen 37–45 [36] ist bereits ersichtlich, welche Lösungsmittelsysteme (Typ ZAFFARONI oder BUSH) sich für die ganz verschieden polaren C_{21}-Steroide eignen und wie sie sich durch R-Werte und Nachweisbarkeit unterscheiden lassen. In erster Linie dienen hier UV-Absorption, Reduktionsteste, Natronlauge-Fluoreszenz, Phosphorsäure, Antimontrichlorid, Trichloressigsäure, Dinitrophenylhydrazin und andere (vgl. hierzu Abschnitt IV 1 e). Durch Kombination ausgewählter Lösungsmittelsysteme und Indikatoren, gelang NEHER UND WETTSTEIN [295] die papierchromatographische Identifizierung aller bisher in den Nebennieren entdeckten Steroide in Mikromengen; vgl. hierzu auch Tab. 37–45 und die graphische Darstellung in [295]. Es wurden hierbei fast alle der in Fig. 4 erwähnten Lösungsmittelsysteme verwendet. Für eine sehr grosse Anzahl von C_{21}-Steroiden mit und ohne Hydroxylgruppe am C_{21} hat REINEKE [150] R_S-Werte für verschiedene Systeme angegeben,

TABELLE 39

R_S-WERTE (S = CORTISOL) VON CORTICOSTEROIDEN (UV +, BT — UND UV —, BT —) [295]

	P/Tol	*F/CHCl₃*	B_S	*C*	$C^{40°}$	$E_2B^{40°}$	H_3PO_4
Δ^4-Pregnentetrol(11β,17α,20β,21)-on(3)	0.25	0.48	0.20	0.23	0.32	0.68	gelb*
Δ^4-Pregnentriol(17α,20β,21)-dion(3,11)	0.84	1.48	0.67	0.50	0.58	0.79	o*
Δ^4-Pregnentriol(17α,20α,21)-dion(3,11)	0.95	1.59	0.72	0.46	0.58	0.72	o*
Δ^4-Pregnendiol(20β,21)-dion(3,11)	2.41	2.94	1.89	1.34	1.39	1.40	o*
Allopregnanpentol(3β,11β,17α,20β,21)	0.04	0.04		0.10	0.13	0.67	rot**
Allopregnantetrol(3β,17α,20β,21)	0.47	0.46		1.03	1.12	1.88	(rötlich)**

* UV + ** UV —

TABELLE 40

R_S-WERTE (S = CORTICOSTERON) VON OXYGENIERTEN CORTEXONDERIVATEN (MITTELPOLARE CORTICOSTEROIDE U.A.M.), ALLE UV +, BT + [36]

Hydroxy-cortexon	*P/Tol*	*F/Be*	*F/Be–CHCl₃ (1:1)*	*BL₁*	*BL₁^38°*	*F/Cy–Be (1:1)*	*H₃PO₄*
16*α*-	0.19	0.16	0.41		0.31		
15*α*-	0.23	0.19	0.45		0.27		
19-	0.28		0.49	0.40			
11*α*-	0.35		0.56	0.41			grün
7?	0.40	0.26	0.51		0.47		
12*α*-	0.46	0.49	0.77		0.70		
18-	0.58		0.73	0.69		0.44	
6*β*-	0.59		0.73	0.69		0.49	
14*α*-	0.70	0.69	0.90		0.79		
17*α*-	0.77		0.98	1.06		0.99	rotorange
8- od. 9-	0.90	0.64	0.86		0.77		
11*β*- (= Corticosteron)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	gelbgrün
11-Dehydrocorticosteron	2.30		1.36	1.42			(schwach blau)
Cortexon	4.00		1.68	2.19	1.69		(orange)

Alle zeigen die typische gelbe NaOH-Fluoreszenz mit Ausnahme von 19-Hydroxycortexon (blaugrün) und 7*α*-Hydroxycortexon (negativ!). Über vergleichbare R_S-Werte (S=Corticosteron-acetat) der Acetate von Corticosteroiden siehe Tab. 2 in [295].

TABELLE 41

R_S-WERTE (S = CORTICOSTERON) VON CORTICOSTEROIDEN (UV —, BT +) [36]

	P/Tol	*F/Be–CHCl₃ (1:1)*	*BL₁*	*H₃PO₄*
Allopregnantriol(3*β*,17*α*,21)-on(20)	0.14	0.50	0.64	rotviolett
Pregnantriol(3*α*,17*α*,21)-on-(20)	0.18	0.53	0.32	(orange)
Allo-TH-Corticosteron (3*β*,5*α*)	0.24	0.48	0.41	(blauviolett)
TH-Corticosteron (3*α*,5*β*)	0.32	0.63	0.77 (38°)	o
DH-Cortison (5*β*)	0.30	0.68	0.26	blau
Allo-DH-Cortison (5*α*)	0.32	0.46	0.31	blau
Allo-TH-11-Dehydrocorticosteron (3*β*,5*α*)	0.48	0.83	0.86	o
TH-11-Dehydrocorticosteron (3*α*,5*β*)	0.60	0.97	0.71	o
Allo-DH-Corticosteron (5*α*)	1.81 (tailing)	1.35	1.43	o
Pregnandiol(17*α*,21)-dion (3,20)	1.57 (tailing)	1.34	1.46	(orange)
Allo-TH-Cortexon (3*β*,5*α*)	2.03	1.76	2.03	o
DH-11-Dehydrocorticosteron (3*α*,5*β*)	2.81	1.68	1.73	o
Allo-DH-11-Dehydrocorticosteron (3*β*,5*α*)	3.02	1.62	1.69	o

deren Wiedergabe hier zu weit führen würde. Teilweise sind diese Steroide in den eigenen Tabellen dieses Kapitels enthalten. Zu erwähnen sind jedoch die weniger bekannten, aber ebenfalls bewährten Lösungsmittelsysteme [150, 378]: Carbitol (=Diäthylenglykol-monoäthyläther)/Methylcyclohexan und Carbitol-Formamid (1:1)/Hexan. Es sei hier vor allem auch auf die sehr nützlichen Angaben von ZAFFARONI [178, 233] sowie diejenigen von BUSH in [105, 177, 181] und SAVARD [180, 232]

TABELLE 42

R_S-WERTE (S = CORTICOSTERON) VON CORTICOSTEROIDEN (UV +, BT — UND UV —, BT —) [36]

	P/Tol	*F/Be–CHCl₃ (1:1)*	*BL₁*	
Δ^4-Pregnendiol(20β,21)-dion(3,11)	0.16	0.47	0.31	*
Δ^4-Pregnentriol(17α,20β,21)-on(3)	0.20	0.50	0.39	*
Δ^4-Pregnenol(17α)-dion(3,20)	3.11	1.85	1.27	J–KJ: blau*
				$SbCl_3$
Allopregnantriol(3β,17α,20α)	0.30	1.06	1.11	rötlich**
Pregnantriol(3α,17α,20α)	0.40	1.07	1.08	blau**
Allopregnantriol(3β,17α,20β)	0.42	1.28	1.15	rötlich**
Allopregnandiol(3β,17α)-on(20)	1.12	1.68	2.13	**

* UV + ** UV —

TABELLE 43

R_S-WERTE (S = CORTEXON) VON C_{21}-STEROIDEN UND IHREN ACETATEN (UV +, BT +) [36, 295]

	P/Tol	*F/Cy–Be (1:1)*	B_3	$A^{38°}$	
Corticosteron	0.24	0.04	0.07		
17-Hydroxycortexon	0.14	0.05			
11-Dehydrocorticosteron	0.55	0.13	0.15		
1-Dehydrocortexon	0.77	0.60	0.64	0.38	
Cortisonacetat	0.34	0.08	0.11		
Corticosteronacetat	0.84	0.51	0.61		
17-Hydroxycortexonacetat	0.79	0.67	0.68		
11-Dehydrocorticosteronacetat	1.11	0.96	0.81		
Cortexonacetat	1.33	1.66	1.62	2.48	
19-Hydroxycortexon-21-acetat	0.45	0.14	0.12		NaOH-Fluoreszenz
19-Hydroxycortexon-19-acetat	0.97	0.56	0.45		blaugrün
19-Hydroxycortexon-19,21-diacetat	1.25	1.51	1.19	1.00	
6β-Hydroxycortexon-diacetat		1.57		1.45	
6α-Hydroxycortexon-diacetat			1.48	1.78	

TABELLE 44

R_S-WERTE (S = CORTEXON) VON C_{21}-STEROIDEN (UV —, BT + UND UV —, BT —) [36]

	P/Tol	*F/Cy–Be (1:1)*	B_3	
Pregnantriol(3α,17α,21)-on(20)	0.36	0.21	0.33	*
Allo-DH-Corticosteron(5α)	0.49	tailing	0.24	*
Δ^5-Pregnendiol(3β,21)-on(20)	0.47	0.77	0.68	*
Allo-TH-Cortexon (3β,5α)	0.48	0.87	0.79	*
DH-11-Dehydrocorticosteron (5β)	0.75	0.32	0.35	*
Allo-DH-11-Dehydrocorticosteron (5α)	0.80	0.33	0.37	*
Pregnanol(21)-trion(3,6,20)	0.81	0.12		NaOH-Fluoreszenz gelb!*
Allopregnanol(3α)-dion(11,20)	0.88			1.10 (F/Be)**
Allopregnanol(3β)-on(20)	1.05	1.70		**
Δ^5-Pregnenol(3β)-on(20)	1.04	1.87	1.37	2.96 ($A^{38°}$)**

* BT + ** BT —

Literatur S. 252/258.

TABELLE 45

R_S-WERTE (S = CORTEXON) VON C_{21}-STEROIDEN UND DERIVATEN (UV+, BT—) [36]

	P/Tol	*F/Cy–Be* (1:1)	B_3	$A^{38°}$	
17*α*-Hydroxyprogesteron	0.73	0.93	0.78	0.64	
11-Ketoprogesteron		1.35	1.09	1.23	
Progesteron	1.28	1.86	1.66	4.78	NaOH-Fluoresz. schwach
1-Dehydro-progesteron		1.84	1.41	2.50	NaOH-Fluoresz. negativ
Δ^4-Pregnenol(20*α*)-on(3)	0.88	1.50	1.17	1.16*	
Δ^4-Pregnenol(20*β*)-on(3)	0.99	1.59	1.29	1.82*	
Δ^4-3,11-Diketoätiocholensäure-methylester	1.21	1.78	1.38	2.08	
Δ^4-3-Keto-18-hydroxy-ätiocholensäure-20 → 18-lacton		0.90			
Δ^4-3-Keto-11*β*-hydroxy-18-oxo-ätiocholensäure-20 → 18-lacton (Aldosteronlacton)		0.47	0.36		
11*β*-Hydroxyprogesteron-18-säure -18 → 11-lacton		0.32	0.29		

* 22° C

TABELLE 46

LÖSUNGSMITTELSYSTEME VON EBERLEIN UND BONGIOVANNI [347]

NB_1	Isooctan–Toluol–Methanol–Wasser	(25:25:35:15)
NB_2	Isooctan–Toluol–Methanol–Wasser	(16.5:33.5:30:20)
E_1	Isooctan–Methanol–Wasser	(50:45:5)
E_2B	Isooctan–*tert.*-Butanol–Wasser	(50:25:45)
E_4	Isooctan–*tert.*-Butanol–Methanol–Wasser	(50:22.5:22.5:5)
E_5	Isopropyläther–*tert.*-Butanol–Wasser	(40:25:30)
E_9	Hexan–*tert.*-Butanol–Methanol–Wasser	(50:22.5:22.5:20)

hingewiesen, die im einzelnen bereits an anderer Stelle dieses Kapitels diskutiert worden sind. Die BUSH-Technik wurde auch insoferne variiert, indem man, um die Equilibrierungszeit zu vermeiden, das Papier direkt mit einer Lösung von Aceton–Wasser 7:3 tränkte und dann wassergesättigte Mischungen von Hexan, Benzol, Toluol und Alkoholen als mobile Phase verwendete [345]. Die ursprüngliche Methode hat sich jedoch bisher behaupten können. Verschiedene Varianten über BUSH-systeme, besonders für stark polare Corticosteroide sind von PECHET [346] angegeben worden, wobei die Papiere ebenfalls zuerst mit der wässrigen Phase imprägniert werden. Interessantere Varianten haben EBERLEIN UND BONGIOVANNI [347] eingeführt (vgl. Tab. 46). Sie equilibrieren etwa 10° höher als nachher chromatographiert wird. Nach unseren Erfahrungen erhält man jedoch gleichmässigere Ergebnisse wenn die Temperatur über die ganze Zeit konstant gehalten wird, vorteilhaft wie bei den BUSH-Systemen auf etwa 38°. Von den neuen Systemen erwies sich besonders das E_2B genannte für Corticosteroide als nützlich (s. Tab. 37–39), da die Sequenz der R_S-Werte teilweise eine andere ist als bei den übrigen Systemen (vgl. auch [305]). Neuerdings ist auch wieder Äthylenglykol/Toluol statt Propylenglykol/Toluol für spezielle

TABELLE 47

R_F-WERTE VON RELATIV SCHWACHPOLAREN STEROIDEN UND IHREN ESTERN IN ABHÄNGIGKEIT VERSCHIEDENER CHROMATOGRAPHIE-BEDINGUNGEN [304]

Substanz	System	A (Bush)*	a	b	c	
	Stationäre Phase	80%ig Methanol	80%ig Methanol	70%ig Methanol	80%ig Methanol	80%ig Methanol
	Mobile Phase	Leichtpetroleum 80–100°	Ligroin 90–100°	n-Hexan	Leichtpetroleum 55–65°	Leichtpetroleum 55–65°
	Technik	absteigend	absteigend	absteigend	aufsteigend	aufsteigend
	Temperatur	34°	37°	37°	37°	37°
	Papier	Whatman No. 4	Schleicher u. Schüll 2045b	Schleicher u. Schüll 2045b	Whatman No. 4	Whatman No. 1 Schleicher u. Schüll 2043a, b, 2040b
	Equilibrierung	bis 12 Std.	1–12 Std.	1–6 Std.	1 Std.	1 Std.
	Laufzeit	45 cm in 100–180 min	20 cm in 120 min	20 cm in 120 min	19–25 cm in 60 min	19–25 cm in 60 min
Testosteron		0.40		0.15	0.13	0.08
17β-Methylandrostendiol					0.16	0.11
17α-Methyltestosteron					0.28	0.18
Dehydroepiandrosteron			0.38	0.36	0.29	0.19
17β-Äthylandrostendiol					0.31	0.21
Isoandrosteron				0.36	0.33	0.29
Δ^4-Androstendion		0.70		0.39	0.34	0.25
17β-Oestradiolmonoacetat					0.36	0.25
Cortexonacetat		0.70	0.54	0.50	0.42	0.27
Δ^1-Androstendion					0.50	0.37
Androsteron			0.60	0.63	0.51	0.38
Allopregnanol(3β)-on(20)					0.53	0.38
Δ^5-Pregnenolon			0.61	0.65	0.54	0.31
17β-Oestradioldiacetat					0.61	0.49
Progesteron		0.85	0.72	0.73	0.68	0.51**
$\Delta^{11,12}$-Dehydroprogesteron			0.72	0.73	0.68	0.51**
17β-Oestradiolmonobenzoat					0.81	0.65
Δ^5-Androstendiolmonoacetat					0.85	0.70
Dehydroepiandrosteronacetat			0.92	0.92	0.93	0.81
Δ^5-Androstendioldiacetat			0.93	0.93		
Δ^2 oder Δ^3-Androsteron					1.00	0.88
Δ^5-Pregnenolonacetat					1.00	0.94
Cholesterin			0.93	0.94		

* In der 1. Spalte sind die Originalwerte von BUSH für das System A vergleichsweise aufgeführt.
** 0.38 bei Schleicher und Schüll-Papier 2045b.

Zwecke verwendet worden [348], während wasserfreie Xylol–Methanol-Systeme [349] keinen ersichtlichen Vorteil bieten. Für schwach polare $C_{21}O_2$ und $C_{21}O_3$-Steroide hat AXELROD [231] neben bereits erwähnten Systemen Formamid/Decalin und 1,3-Butandiol/Methylcyclohexan verwendet. Die Wandergeschwindigkeit in cm/Std. von sehr hoch polaren Corticosteroiden mit einigen üblichen Systemen ist in [350] angegeben. Über die relativen Wandergeschwindigkeiten von Aldosteron und seinen

Acetaten vgl. [295] und [351]. GRAY *et al.* [352] geben u.a. folgende R_F-Werte im BUSH B_5-System für:

Prednisolon	0.22
Cortisol	0.31
Prednison	0.44
Cortison	0.46

Noch ausgeprägtere Unterschiede zwischen Δ^4- und $\Delta^{1,4}$-3-Ketosteroiden sind mit einigen ZAFFARONI-Systemen erhältlich. Als weitere Systeme für Corticosteroide sind noch Butanol–Wasser [335] und Heptanol–Wasser [206, 207] verwendet worden, letzteres als reversed phase System, doch sind diese den meisten anderen aus dem einen oder anderen Grund unterlegen. ZANDER *et al.* [304] haben eine Reihe von BUSH-Varianten für die Chromatographie relativ schwach polarer Steroide im Hinblick

TABELLE 48

MITTLERE R_F-WERTE UND FARBREAKTIONEN VON PROGESTERON-METABOLITEN [353]

	P/Tol	B_4	*$SbCl_3$*	*$ZnCl_2$*
			UV-Fluoreszenzen	
Pregnantriol(3α,17α,20α)	0.08	0.44	rot	blau
Allopregnandiol(3β,20α)	0.31	0.77	rosa	blau
Pregnandiol(3α,20α)	0.32	0.73	gelborange	blau
Allopregnandiol(3α,20α)	0.35	0.71	rosa	blau
Allopregnandiol(3β,20β)	0.41	0.78	rosa	blau
17α-Hydroxyprogesteron	0.59	0.79	blau	blau
Δ^5-Pregnenol(3β)-on(20)	0.78	0.88	rot	rosa
Allopregnanol(3β)-on(20)	0.86	0.89	blau	o

TABELLE 49

R_F-WERTE VON PREGNANTRIOLEN UND ÄHNLICHEN STEROIDEN IM SYSTEM ISOOCTAN–TOLUOL–METHANOL–WASSER (5:15:16:4), 22° C [242]

	R_F-Wert	*Farbreaktion mit Trichloressigsäure*	
		im Tageslicht	*im UV-Licht*
Pregnantriol(3α,17α,20α)	0.33	blau	blau
Pregnantriol(3α,17α,20β)	0.42	blau	blau
Allopregnantriol(3α,17α,20α)	0.38	blau	beigegrau
Allopregnantriol(3α,17α,20β)	0.48	blau	beigegrau
Δ^5-Pregnentriol(3β,17α,20α)	0.26	violett	rosa
Δ^5-Pregnentriol(3β,17α,20β)	0.33	violett	rosa

Entsprechende Verbindungen mit 11-Ketogruppe zeigen teils keine Farbreaktionen.

auf ihre Eignung besonders für Progesteron untersucht (s. Tab. 47) und für letzteres auch optimale Bedingungen der Nachweisbarkeit geprüft und auf dieser Basis eine Bestimmungsmethode für Progesteron ausgearbeitet. Progesteron-Metaboliten, insbesondere Pregnandiole und Pregnantriole, lassen sich z.B. in Propylenglykol/Toluol, Bush B_4 oder Toluol–Isooctan–Methanol–Wasser (15:5:16:4) trennen und mit

Antimontrichlorid, Zinkchlorid oder Trichloressigsäure [242] nachweisen [242, 256, 353]. Tab. 48 und 49 enthalten einige R_F-Werte und Farbreaktionen.

Zur quantitativen Bestimmung vgl. Abschnitt IV 1 i und [354]. Die Auswertungsmöglichkeiten auf Grund von UV-Absorption, Reduktionstesten, Natronlauge-Fluoreszenz etc. sind hier sehr zahlreich, besonders günstig in Fällen wo der Fleck radiochemisch lokalisiert werden kann [160, 289, 355]. Auch die Densitometrie von Formazanflecken direkt auf den transparent gemachten Chromatogrammen ist hier erwähnenswert [235]. Auf weitere Anwendungsbeispiele, deren Studium für die papierchromatographische Technik immerhin sehr empfehlenswert ist, kann nur hingewiesen werden: Papierchromatographische Analyse von Corticosteroiden und ihren Metaboliten aus Urin [322, 333] und Rinder-Nebennieren [280]; Bestimmung von Aldosteron in Nebennieren [139] oder Harn [210, 305], Isolierung von Corticosteroiden [295]. Schliesslich wären als weitere interessante Anwendungsbeispiele u.a.

TABELLE 50

R_F-WERTE VON HERZGLYKOSIDEN UND AGLYKONEN [228, 245, 248, 367]

	I	*II*	*III*	*IV*	*V*	*VI*	*VII*	*VIII*	*IX*
Digitalinum verum					0.95	*F*			0.16
Gitorin					0.78	*F*			
Digilanid C	0.08	0.12	0.15		0.86	*F*	0.25		0.33
Digilanid B	0.14	0.18	0.25		0.66	*F*	0.10		0.47
Digilanid A	0.37	0.46	0.49		0.28	*F*	0.03		0.85
Desacetyldigilanid C	0.01	0.01	0.02						0.13
Desacetyldigilanid B	0.02	0.03	0.05		0.73	*F*			0.19
Desacetyldigilanid A	0.07	0.10	0.15		0.39	*F*			0.50
Strospesid								0.75	0.61
Digoxin	0.68	0.75	0.76		0.29	0.72		0.16	
Digoxigenin	0.58	0.64	0.61					0.32	
Gitoxin	0.76	0.81	0.82	0.40	0.18	0.55		0.29	
Gitoxigenin	0.82	0.84	0.84	0.80	0.17	0.52		0.42	
Acetyldigoxin-α								0.39	
Acetyldigoxin-β								0.45	
Acetylgitoxin-α					0.08	0.41		0.59	
Acetylgitoxin-β								0.64	
Digitoxin	0.88	0.91	0.90	0.68	0.03	0.27		0.69	
Digitoxigenin	0.92	0.93	0.92	0.91	0.03			0.81	
Acetyldigitoxin-α und -β					0.02	0.21		0.90–0.95	
Oleandrin								0.93	
Oleandrigenin								0.72	
Nervifolin								0.55	
Cymarin								0.55	
Allocymarin								0.48	
Strophanthidin								0.40	
Allostrophanthidin								0.32	
Isostrophantidin								0.76	
Strophanthidol								0.26	
Cymarol								0.36	
Emicymarin								0.11	
Alloemicymarin								0.07	

Lösungsmittelsysteme I–IX siehe Text. F = Lösungsmittelfront.

zu erwähnen: Identifizierung von Nebennierenrindenhormonen im menschlichen Plasma [341], in menschlichen Nebennieren und Nebennierentumoren [323], Isolierung von Aldosteron aus Harn [356], Identifizierung von Corticosteroid-Metaboliten aus Harn [296], chemische Bestimmung von Progesteron [215].

(e) *Glykoside und Aglykone (Cardenolide, Bufadienolide)*

Die Papierchromatographie hat sich auch auf diesem Gebiet als äussert fruchtbar erwiesen; es ist dementsprechend eine grosse Anzahl von Arbeiten erschienen, die die chromatographische Methodik dieser hochpolaren Stoffgruppe ständig verbessert haben. Neben vielen wässrigen Systemen haben sich auch hier die für Steroide entwickelten ZAFFARONI- und BUSH-Systeme verwenden lassen, wobei im allgemeinen die Chromatographie auf Blättern derjenigen auf Streifen vorgezogen wird.

(1) *Digitalis- und Strophanthus-Glykoside und Aglykone.* Bereits 1950 ist von SVENDSEN UND JENSEN [245] eine brauchbare Methode angegeben worden. Sie verwendeten Chloroform–Methanol–Wasser-Gemische (I–III in Tab. 50) zur Chromatographie und Trichloressigsäure als Reagens; die Reaktion ist viel empfindlicher für Purpureaglykosid B und Digilanid B sowie deren Spaltungsprodukte (intensiv blau), als für die entsprechenden A-Glykoside und Spaltungsprodukte (rötlich); Digilanid C, Digoxin und Digoxigenin geben stahlblaue Farben. Die Systeme erlauben jedoch im

TABELLE 51

LAUFSTRECKEN VON HERZGLYKOSIDEN, AGLYKONEN UND IHREN ACETATEN IN CM [243]

Substanz	*F/Benzol*		*P/Toluol*	
	24 Std.	*48 Std.*	*24 Std.*	*48 Std.*
Periplogenin	2.8	4.2	0.7	2.7
Periplogenin-acetat	21.6	43.6	6.9	16.9
Alloperiplogenin-acetat	15.0	32.0	6.6	
Alloperiplocymarin	11.8	28.9	2.5	7.1
Periplocymarin	16.2	38.9	3.8	10.0
Emicymarin	0.8	1.1	0.7	3.0
Emicymarin-acetat			13.6	23.4
Alloemicymarin	1.0	1.4	1.0	2.5
Cymarol	2.5	3.6	1.0	3.0
Strophanthidol	2.0	2.6	0.6	1.4
Strophanthidol-acetat	8.3	15.8	4.7	12.0
Strophanthidin-acetat	4.1	6.1	2.8	7.1
Cymarin	4.0	6.2	2.0	5.1
Cymarin-acetat			15.1	
Sarmentocymarin	3.3	4.1	0.8	3.1
Sarmentogenin	2.5	2.5	1.0	2.0
Sarmentogenin-acetat			15.5	25.3
Sarmentosid A	2.3	2.3	0.7	1.3

allgemeinen nur den Einsatz von je 5γ Substanz wegen der Tendenz zur Schwanzbildung. Die Methodik ist später verbessert worden durch Verwendung des ZAFFARONI-Systems Formamid/Benzol–Chloroform (4:6) und von mehreren Farbreaktionen wie Antimontrichlorid, DNB, Pikrinsäure, Nitroprussid-Natium etc. (vgl. Nachweisreak-

tionen Abschnitt IV 1 e; [228]), und durch fluorometrische Bestimmung der Eluate *in vitro* [357]. Formamid/Chloroform und Benzol–Chloroform-Gemische wurden 1951 bereits von SCHINDLER UND REICHSTEIN [229] für die Chromatographie von zahlreichen Glykosiden und Aglykonen aus Strophanthus-Samen eingeführt. Die Autoren geben relative Zahlen an für die Wanderungsgeschwindigkeit und bemerkten, dass viele Monoglykoside rascher wandern als die Aglykone. HEFTMANN *et al.* [234, 243] verwenden ebenfalls ZAFFARONI-Systeme wie Formamid/Benzol und Propylenglykol/Toluol im Durchlaufchromatogramm. Die so erhaltenen Laufstrecken einiger Car-

TABELLE 52

R_F-WERTE UND FARBREAKTIONEN VON EINIGEN HERZGLYKOSIDEN IM SYSTEM METHANOL–CHLOROFORM–WASSER (10:10:6) [273]

Substanzen	R_F-*Werte*	*Anisaldehyd–Eiseseg–Schwefelsäure-Reagens*		*Reagens nach Raymond*	*Reagens nach Legal*
		sichtb. Licht	*UV-Licht*	*sichtb. Licht*	*sichtb. Licht*
Diginin	0.24	grünblau	dunkelblau	blau	rot
Digitoxin	0.51	grünblau	dunkelblau	blau	rot
Gitoxin	0.70	grünblau	hellblau	blau	rot
Saponin	0.77	gelb	dunkelviolett	—	—
Gitoxigenin	0.84	—	hellblau	blau	rot
Purp.-glyk. A	0.84	grünblau	hellblau*	blau	rot
Purp.-glyk. B	0.93	grünblau	hellblau	blau	rot

* Die an sich dunkelblaue Fluoreszenz des Purpureaglykosids A wird durch die hellblaue Fluoreszenz des Gitoxigenins, welches den gleichen R_F-Wert aufweist, überdeckt.

TABELLE 53

R_F-WERTE EINIGER AGLYKONE UND DERIVATE IM SYSTEM BUSH B_5 [208]

Substanz	R_F-*Wert*
"β"-Anhydrodigitoxigenin	0.91
"α"-Anhydrodigitoxigenin	0.63
"β"-Anhydrodigoxigenin	0.73
"β"-Anhydrodigoxigenon	0.59
"β"-Anhydrosarmentogenin	0.69
"β"-Anhydrouzarigenin	0.94
Digitoxigenin	0.76
Digitoxigenin-acetat	0.89
Digoxigenin	0.075
Digoxigenin-diacetat	0.70
Digoxigenon	0.68
Gitoxigenin	0.26
Gitoxigenin-diacetat	0.88
Periplogenin	0.43
Sarmentogenin	0.10
Sarmentogenin-diacetat	0.85
Sarnovid-mono(?)acetat	0.72
Sarverogenin	0.40
Strophanthidin	0.16
Strophanthidol	0.05
Uzarigenin	0.83

denolide sind in Tab. 51 wiedergegeben, eine graphische Darstellung in [234], Farbreaktionen mit Trichloressigsäure und Tollens Reagens in [243]. HASSALL UND MARTIN berichteten 1951 [326] über ihre Versuche mit verschiedenen Mischungen aus Wasser, Ester, Ketonen, Alkoholen, Chloroform und Natriumbenzoat, welche zum Teil brauchbare Systeme darstellten (vgl. auch JAMINET [241, 246]). Es folgten weitere Varianten auf dieser Basis (Acetylderivate von Gitoxigenin [358], Digitalis [244, 359, 360]), teilweise unter Verwendung von mit Silikon hydrophobierten Papieren [203, 273] und aromatischer Aldehyde als Indikatoren [203, 273, 276], vgl. Tab. 52. Inzwischen ist auch das System B_5 von BUSH mit Erfolg zur Trennung herangezogen worden ([208], s. Tab. 53). Weiterhin wurden auch mit butanolgesättigtem Wasser teilweise gute Chromatogramme erhalten [257]. Allerdings ist hier der R_F-Wert der glukosefreien Substanzen der Purpurea- und Lanata-Gruppe recht klein. Entweder bedient man sich daher des Durchlaufchromatogramms oder eines Zusatzes von Eisessig oder Methanol: Butanol–Eisessig (bzw. Methanol)–Wasser (5:1:5); die wässrige Phase ist für die Purpurea- und Lanata-Gruppe, die Butanol-Phase fur die Strophantus-Gruppe geeignet. Auch eine quantitative Auswertung erscheint möglich. Für die Bestimmung der Komponenten in Digitalisproben benützten SILBERMAN UND THORP [287] Essigester–Benzol–Wasser mit 1.5–7.5% Alkohol und Fluoreszenzphotographie mit densitometrischer Auswertung. Das System wurde später offensichtlich verbessert durch zusätzliche Verwendung von Chloroform [361]. Solche Systeme wurden weiterhin vielfach abgewandelt und je nach Bedarf bloss für Gruppentrennungen oder Einzeltrennungen der Digitalisglykoside und Genine verwendet [363]. Noch kompliziertere Lösungsmittelgemische [364] befriedigten kaum. Mit einem reversed phase System konnten TSCHESCHE *et al.* [248] gute Resultate erreichen. Das Papier wird hierbei mit der organischen Phase der Gemische Octanol–Pentanol–Wasser–Formamid 5:6:8:2 (V), 6:2:1:4 (VI) oder z.B. Pentanol–Wasser 1:1 (VII) imprägniert und die wässrige Phase dient als mobile (s. Tab. 50). Die quantitative Bestimmung erfolgt in den Eluaten mit Xanthydrol. Für die Cardenolide aus *Convallaria majalis* werden nebst den obigen Systemen noch Isobutanol–Wasser (VIII) und Butanol–Pyridin–Wasser 3:1:3 (IX, Tab. 50) nach folgendem Schema verwendet [362]:

Substanzen	*Systeme*				
	V	*VI*	*VII*	*VIII*	*IX*
Genine + Anhydrogenine	+	+			
Acetate	+				
Vallarotoxin	+				
Majalosid, Convallatoxin, Convallatoxol			+	+	
Convallosid, Convallatoxosid, Gluco-Convallosid			+	+	+

In Weiterentwicklung ihrer Methodik (s. oben) haben REICHSTEIN *et al.* [365] ausgezeichnete Systeme für stark polare Glykoside und Aglykone gefunden, wobei mit Wasser getränktes Papier als stationäre Phase und *n*-Butanol oder *n*-Butanol–Toluol-Gemische als mobile Phase dienten. Letzteres System ist besonders brauchbar für

Convallatoxin, Digitalinum-verum-monoacetat, Gofrusid, Frugosid, Nigrescigenin, Odorobiosid-G-monoacetat, Odorotriosid-G-monoacetat, Sargenosid-diacetat, Thevebiosid, Thevetin; das Wasser–Butanol-System für: Acolongiflorosid K, Ouabain, Sarmentosid A, *k*-Strophanthin-β, *k*-Strophanthosid, Uzarin. Gelegentlich tritt eine leichte Schwanzbildung auf. Die Resultate sind in graphischer Form wiedergegeben. Diese Systeme sind seither von der REICHSTEIN-Gruppe für den Nachweis von zahlreichen anderen Glykosiden ausgiebig und mit gutem Erfolg benützt worden, wie aus den vielen Arbeiten in den letzten Jahrgängen der *Helvetica Chimica Acta* hervorgeht. Als besonders instruktive Beispiele seien hier lediglich die Isolierungen aus *Strophanthus ledienii* [87, 89], *Erysinum crepidifolium* [90] und *Glossostelma spathulatum* [366] erwähnt, wobei auch eine grosse Anzahl von Farbreaktionen beschrieben wurde. Für die vollständige Trennung von Digitalisglykosiden und Aglykonen im aufsteigenden Chromatogramm gibt KAISER [367] 2 neue Lösungsmittelgemische vom ZAFFARONI-Typ an: Formamid/Xylol–Methyläthylketon (1:1) für die Glykoside der Digitoxinstufe und Aglykone und Formamid/Chloroform–Tetrahydrofuran–Formamid (5:5:0.65) für die Primärglykoside (s. VIII und IX in Tab. 50). System VIII ist ausserdem für zahlreiche andere wenig wasserlösliche Herzglykoside gut geeignet. Ausserdem werden noch weitere, ähnliche Lösungsmittelsysteme für spezielle Trennungen sowie die Möglichkeiten zur Identifizierung der in den Herzglykosiden vorkommenden Zucker beschrieben. Nach der Methode der Mehrfachchromatographie in Formamid/Xylol–Methyläthylketon (2:1 oder 3:1) lassen sich die α- und β-Formen von Acetyldigitoxin, Acetylgitoxin und Acetyldigoxin trennen. Über eine Variante mit Äthylenglykol/Chloroform vgl. [368].

(2) *Glykoside und Aglykone vom Scilla-Bufo-Typ.* Für die Chromatographie selbst eignen sich Lösungsmittel wie sie bei den Herzglykosiden beschrieben worden sind. Als besonders vorteilhaft erwiesen sich folgende Varianten vom ZAFFARONI-Typ: Propylenglykol–Wasser (4:1)/Benzol–Petroläther (1:1) oder Benzol–Chloroform (1:1) sowie Formamid/Benzol–Chloroform (6:4) [96, 369], wobei die Resultate teils graphisch [96] teils nach R_F-Werten [369] angegeben sind. Als Nachweis dient in erster Linie die Farbreaktion mit Antimontrichlorid (Angabe der verschiedenen Farben s. [96, 369]) sowie die Photokopie mit einer Filterkombination bei 300–350 mμ, womit der für den Scilla-Bufo-Typ charakteristische Cumalinring spezifisch erfasst wird [225]. Die neueste Zusammenstellung findet sich in [385].

(*f*) *Saponine und Sapogenine*

Für Saponine haben sich bisher wässrige Systeme am besten bewährt und zwar teils saure wie z.B. *n*-Butanol–Essigsäure–Wasser (4:1:5) [275, 286], teils neutrale wie Chloroform oder Benzol in Mischungen mit verschiedenen wässrigen Alkoholen (Butanol, Isoamylalkohol) oder selbst basische, wie Benzol–Butanol–Pyridin–Wasser (10:4:1:5) [275]; Antimontrichlorid, aromatische Aldehyde oder Perjodat–Permanganat (s. Nachweisreaktionen IV 1 e) dienen als Indikatoren.

Etwas zahlreicher sind die Angaben über Sapogenine. Von SANNIÉ *et al.* [259, 260, 370] wurden zuerst Benzin–Chloroform–Essigsäure-Systeme vorgeschlagen, die

sich hauptsächlich für die Trennung in verschiedene Gruppen eignen dürften. Neutrale wässrige Systeme wie Petroläther–Toluol–Äthanol–Wasser in Mischungsverhältnissen von 0–40:40–0:1–3:9–7 [247] scheinen jedoch vorteilhaftere Resultate zu liefern, teilweise auch für die Sapogenin-acetate. Schliesslich erwiesen sich auch Systeme vom ZAFFARONI-Typ mit Carbitol oder Formamid als stationäre und Hexan–Octan oder Benzol als mobile Phase [274] als durchaus nützlich, teilweise im Durchlaufchromatogramm unter Benützung von Leitfarbstoffen. In vielen Fällen wird auch auf diesem Gebiet die Anwendung beider Typen von Systemen vorteilhaft sein, vgl. auch [383]. Die Sapogenine lassen sich z.B. mit Antimontrichlorid, Trichloressigsäure, aromatischen Aldehyden oder auf biologischem Wege (auch auf dem Papier) durch ihre Fähigkeit, Blut zu hämolysieren, nachweisen [247].

(g) *Gallensäuren, Steroidcarbonsäuren*

Während sich für die Säureester je nach Polarität die für die Steroidchromatographie üblichen neutralen Systeme vom BUSH- oder ZAFFARONI-Typ eignen (vgl. auch [371]), sind für die freien Säuren saure oder basische Systeme zu verwenden. Als letztere dienen beispielsweise *n*-Propanol–NH_4OH–Wasser (90:2:8) oder besser *n*-Propanol–Äthanolamin–Wasser (90:5:5) [372], Collidin–Wasser (10:3.5) in Ammoniakatmosphäre [261] oder Isoamylalkohol gesättigt mit 3 *M*-Ammoncarbonatpuffer bzw. 2%ig. Ammoniak [271]. Als saure Systeme haben sich z.B. folgende bewährt: stationäre Phase 70%ige Essigsäure (Imprägnierung der Papiere), mobile Phase Isopropyläther–Heptan 6:4, 2:8 oder 8.5:1.5 [251, 252]; Butanol, gesättigt mit 3%iger wässriger Essigsäure [251], 80%ige Essigsäure [271] und Toluol–Essigsäure–Wasser 1:1:2 [240]. Diese Systeme sind meist auch für die konjugierten Tauro- und Glyko-Gallensäuren geeignet, wobei auf- oder absteigend chromatographiert werden kann. Als Nachweis dienen u.a. Antimontrichlorid, Phosphorsäure, Phosphomolybdänsäure, aromatische Aldehyde und in Spezialfällen Jodkaliumjodid (vgl. Nachweisreaktionen Abschnitt IV 1 e) und im besonderen die Angaben über zahlreiche Säuren und Ester in [271]. Gallensäuren mit reaktiven Ketogruppen lassen sich auch als GIRARD-Derivate chromatographieren [373], im allgemeinen aber wird man das Arbeiten mit freien Säuren oder ihren Estern vorziehen. Zur quantitativen Bestimmung von papierchromatographisch getrennten Gallensäuren vgl. [374, 375], zur autoradiographischen Auswertung [261].

(h) *Steroid-Konjugate*

Wie bei den Gallensäuren handelt es sich hier um saure Verbindungen (Konjugation mit Glucuron- oder Schwefelsäure) für welche sich einige wässrige Systeme gut zu bewähren scheinen. Zu erwähnen sind besonders *n*-Butylacetat–*n*-Butanol–10%ige Essigsäure (oder 10%ige Ameisensäure) im Verhältnis 4:1:5, bzw. *n*-Butylacetat–Methanol–0.1 *M*-Barbituratpuffer pH 8.2 (3:1:1; einphasig) oder Äthylacetat–*n*-Butanol–0.2% wässr. Ammoniak (7:1:8) oder Isoamylalkohol–conc. NH_4OH–Wasser (55:27:18). Die R_F-Werte einer grösseren Anzahl von Glucuroniden [250, 386] und Sulfaten [376, 386] sowohl von C_{19}-Steroiden, Progesteron- als auch Corticosteroid-

Literatur S. 252/258.

Metaboliten sind in der Literatur angegeben. Auch wassergesättigtes Butanol oder Äthylacetat–*n*-Butanol–0.2 *N*-Essigsäure (9:1:10) sind dafür geeignet, einschliesslich Oestrogen-Sulfate [263, 386]. Die Nachweismöglichkeiten sind recht zahlreich [386], z.B. UV-Absorption, *m*-Dinitrobenzol, Phosphomolybdänsäure, Antimontrichlorid sowie andere und im Fall der Sulfate Rhodizon [376].

(*i*) *Amino-Steroide und Steroid-Alkaloide*

Als letzte Klasse seien schliesslich basisch substituierte Steroide und einige Alkaloide mit steroidähnlichem Skelett erwähnt. Für Steroidamine, die nur ein Stickstoffatom enthalten wird wassergesättigtes Butylacetat oder ein inverses System mit Kerosin (Paraffinöl) und wässrigem Alkohol vorgeschlagen [194]. Mit diesen Systemen lässt sich auch die Auftrennung von einigen 3*α*- und 3*β*-Isomeren erreichen. Für die Chromatographie von Alkaloiden aus *Holarrhenia antidysenterica* (Conessin, Solanin etc.) geben die gleichen Autoren R_F-Werte in Amylalkohol–Essigsäure–Wasser (4:1:5; obere Phase) oder Paraffinöl/Äthanol–NH_4OH–Wasser (75:2:23; inverses System) an. Diese Systeme lassen sich in weiten Grenzen variieren; u.a. wurde auch Butanol–Essigsäure–Wasser (4:1:5; obere Phase) als sehr nützlich befunden [278] für die genannten Alkaloide. Mit Äthylacetat–Essigsäure–Wasser (3:1:3; unter Zusatz von 15 Vol. % Äthanol zur oberen Phase) lassen sich die isomeren Solanine und Chaconine gut differenzieren [253]. Für Hydrierungsprodukte der Veratrinalkamine diente mit *M*-KCl imprägniertes Papier und mit 2%ig. HCl gesättigtes Butanol als mobile Phase [279], für hypotensive Alkaloide aus *Veratrum album* (Protoveratrine etc.) wiederum ein saures System: Äthylenchlorid–Essigsäure–Wasser (49.5:1:49.5) oder andere Lösungsmittel anstelle des Äthylenchlorids [377]. Als Indikatoren können teils solche für Steroide, teils solche für Alkaloide verwendet werden. Häufig kommen Antimontrichlorid, Antimonpentachlorid, Phosphomolybdänsäure, andere Fluoreszenzreaktionen (teilweise besitzen die Substanzen im UV Eigenfluoreszenz) oder z.B. Kaliumjodplatinat oder -wismuthat in Frage (s. Nachweisreaktionen, IV 1 e).

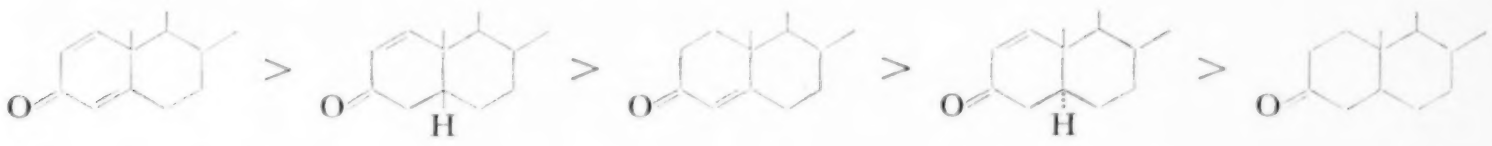
3. Chemische Struktur und chromatographisches Verhalten

Für das Verhalten der Steroide bei der Verteilungschromatographie lassen sich auf Grund systematischer Untersuchungen [178, 181, 232] und der Tabellen 30–49 eine Reihe von Gesetzmässigkeiten ableiten und zum Teil begründen. In einem gegebenen System ist der R_F-Wert zunächst von der Anzahl der C- und O-Atome abhängig, deren Verhältnis die Polarität der Substanz bis zu einem gewissen Grad bestimmt. Gleichwertige Sauerstoffunktionen vorausgesetzt, nimmt die Polarität z.B. der folgenden Reihe ab (und die R_F-Werte zu): $C_{18}O_2 > C_{19}O_2 > C_{21}O_2$; ebenso laufen z.B. Propionate schneller als entsprechende Acetate. Neben dem C/O-Verhältnis wird der R_F-Wert aber in erster Linie durch die Natur der Sauerstoffunktion bestimmt, deren Polarität sich folgendermassen verhält:

$$>\!COH > >\!C=O > -COOR > >\!C-O-C\!<$$

Literatur S. 252/258.

Laktongruppen üben im allgemeinen einen stärkeren Einfluss aus als gewöhnliche Estergruppen. Je nach Lage im Molekül ist der Einfluss der Ketogruppen unterschiedlich; Polarität der Ketone: C_3 oder $C_{20} > C_{11} > C_6$. Sie wird im weiteren durch konjugierte Doppelbindungen folgendermassen deutlich beeinflusst:



Während die Ringverküpfung (A/B *cis* oder *trans*) bei den Δ^1-3-Ketonen noch eine Rolle spielt, ist dies bei den gesättigten 3-Ketonen praktisch nicht mehr der Fall; sie geben die gleichen R_F-Werte für Allo- und Normalreihe. Isolierte Doppelbindungen, z.B. $\Delta^{9(11)}$ haben ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf den R_F-Wert. Hingegen verhalten sich Δ^5-3β-Hydroxysteroide in den meisten Fällen etwas polarer als die gesättigten wenn nicht zu viele andere Sauerstoffunktionen vorhanden sind. Besonders gross und unterschiedlich ist der Einfluss von Hydroxylgruppen. Er hängt ab

1. von ihrer Konformation (axial oder equatorial)
2. von sterischen Verhältnissen
3. von Wechselwirkungen mit dem Chromatographie-Milieu.

Es liess sich zeigen, dass alle Hydroxylgruppen in equatorialer Stellung stets polarer sind als diejenigen in axialer (vgl. Formelschema II und III auf S. 124) z.B.

$$11\alpha > 11\beta; \qquad 6\alpha > 6\beta; \qquad 7\beta > 7\alpha; \qquad 17\beta > 17\alpha$$

Aus Tabelle 40 ergibt sich für Hydroxy-cortexone z.B. folgende Reihe

für P/Tol: $16\alpha > 15\alpha > 19 > 11\alpha > 7? > 12\alpha > 18 = 6\beta > 14\alpha > 17\alpha > 8$ od. $9 > 11\beta$
für F/Be-$CHCl_3$: $16\alpha > 15\alpha > 19 > 7? > 11\alpha > 18 = 6\beta > 12\alpha > 8$ od. $9 > 14\alpha > 17\alpha > 11\beta$

Für Mono-hydroxy-progesterone ergibt sich aus der Literatur:

mit P/Ligroin: $6\alpha > 16\alpha > 11\alpha > 6\beta > 14\alpha > 11\beta > 17\alpha > 21$

Die Beispiele zeigen, dass stets alle Hydroxylgruppen in equatorialer Stellung (e) polarer sind als jene in axialer Stellung (a), gleichgültig ob es sich um primäre oder sekundäre handelt. Die Differenzierung innerhalb jeder Gruppe (e oder a) wird u.a. durch sterische Faktoren bestimmt sein, und die einzelnen Verschiebungen innerhalb dieser Gruppen (e bzw. a) bei Wechsel von Lösungsmittelsystemen lässt sich wenigstens teilweise durch die Wechselwirkung zwischen Substanzen und Milieu erklären. Die Lage des Gleichgewichts von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Substanz, mobiler und stationärer Phase sowie Cellulose, dürfte hierbei eine bedeutende Rolle spielen (vgl. auch [209] und das eigenartige Verhalten im E_2B-System, [347]). Gerade diese Unterschiede sind es, die für papierchromatographische Identifizierungen von grösstem Wert sind. Beispiele für die Sequenzänderung von Substanzen beim Wechsel von BUSH- auf ZAFFARONI-Systeme sind in den Tabellen leicht zu finden. Hier sei lediglich auf das schon klassische Beispiel des Aldosterons hingewiesen, das, besonders gut zu inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen befähigt, in verschiedenen Systemen im Vergleich zu Cortisol oder Cortison stark wechselnde R_F-Werte aufweist.

Die sterischen Verhältnisse der Ringe A und B bedürfen noch einer näheren Betrachtung. Die häufig zitierte Behauptung, dass Steroide mit 5α-Konfiguration

(A/B *trans*) schwächer polar sind, trifft in dieser Form sicher nicht zu. Die Polarität hängt auch hier weitgehend davon ab, ob sich im Ring A axiale oder equatoriale Substituenten befinden. Während sich, wie erwähnt, 5α- oder 5β-Steroide praktisch nicht trennen lassen, wenn sich im Ring A kein Substituent oder nur eine 3-Ketogruppe befindet, ändert sich die Situation grundlegend bei Vorliegen einer Hydroxylgruppe in 3-Stellung. Unter Verwendung der Indices *a* und *β* für die Hydroxylgruppe in 3- und das H-Atom in 5-Stellung, ergibt sich aus den Tabellen eindeutig folgende Polaritätsreihe (für C_{19}- und C_{21}-Steroide):

$$3\beta,5a \geq 3a,5\beta > 3\beta,5\beta \geq 3a,5a,$$

3-OH	equatorial	axial
	I	II

welche also direkt von der Konformation der Hydroxylgruppen und nicht von der Ringverknüpfung abhängig ist. Der Unterschied in der Polarität zwischen Gruppe I und II ist in den meisten Fällen gut und für Trennungen ausreichend. Der Unterschied innerhalb der einzelnen Gruppen ist durchschnittlich kleiner und hängt ziemlich stark von den übrigen Bedingungen wie Lösungsmittelsystem und zusätzliche Substituenten ab, so dass er für eine Trennung nicht immer ausreicht. Die 20*a*-Hydroxygruppe in C_{21}-Steroiden ist in der Regel polarer als die 20*β*-Gruppe. Ausnahmen sind aber möglich je nach weiteren Substituenten und Lösungsmittelsystemen. Als Beispiel solcher Wechselwirkungen sei erwähnt, dass der Beitrag der 11*β*-Hydroxygruppe zur Polarität im ZAFFARONI-System grösser ist als derjenige der 20-Hydroxygruppen, während im BUSH-System das Gegenteil der Fall ist [350]. Für Cardenolide [243] und Sapogenine [247, 259] gelten die gleichen Gesetzmässigkeiten wie sie für die Steroide diskutiert worden sind. Bemerkenswert ist jedoch, dass manche Monoglykoside schneller laufen als ihre Aglykone (vgl. Tab. 50; [229]).

Bei einer Betrachtung der bisher gefundenen Zusammenhänge zwischen Konstitution und dem Verhalten von Steroiden bei der Verteilungschromatographie sollte man aber auch auf die zusätzlichen und noch schwer vorauszusehenden schwächeren oder stärkeren Adsorptionserscheinungen achten, ebenso wie auf die gelegentlichen Verdrängungseffekte bei Gemischen. Wenn sich einerseits durch die sehr starke Differenzierung der Polarität von verschiedenen Sauerstoffunktionen ausgezeichnete Trennungsmöglichkeiten ergeben, so ist es anderseits leicht möglich, dass Steroide ganz unterschiedlichen Sauerstoffgehaltes in einem bestimmten System den gleichen R_F-Wert haben; so können sich z.B. Triketone wie Hydroxyketone oder Triole wie Dihydroxydiketone verhalten, wobei Unterschiede im C-Gehalt ebenfalls noch ausgleichend wirken können. Umso wertvoller ist hier die schon mehrmals erwähnte Möglichkeit der Differenzierung durch andere Lösungsmittelsysteme, verschiedene Farbreaktionen und zusätzliche physikalisch-chemische Teste (s. IV 1 f).

Herrn Dr. A. WETTSTEIN danke ich bestens für die Förderung dieser Arbeit, Herrn Dr. I. E. BUSH für die Mitteilung unveröffentlichter Befunde und Herrn E. VON ARX für die Ausführung der Zeichnungen.

Literatur S. 252/258.

LITERATUR

1 H. WEIL, *Chem. Ing. Technik*, 23 (1951) 422; *Chem. Ztg.*, 79 (1955) 206, 246.
2 E. LEDERER UND M. LEDERER, *Chromatography*, 2nd ed., Elsevier, Amsterdam, 1957.
3 L. ZECHMEISTER UND L. V. CHOLNOKY, *Die chromatographische Adsorptionsmethode*, 2. Aufl., Springer, Wien, 1938.
4 L. ZECHMEISTER, *Progress in Chromatography 1938–1947*, Chapman & Hall, London, 1950.
5 L. VELLUZ, *Substances naturelles de synthèse*, Vol. 4, Masson, Paris, 1952, S. 105–147.
6 H. G. CASSIDY, *Adsorption and Chromatography; Technique of Organic Chemistry*, Vol. 5; *Fundamentals of Chromatography; Technique of Organic Chemistry*, Vol. 10, 1950, 1957 (A. WEISSBERGER, Ed.), Interscience, New York.
7 G. HESSE, *Adsorptionsmethoden im chemischen Laboratorium*, de Gruyter, Berlin, 1943.
8 T. I. WILLIAMS, *Elements of Chromatography*, Blackie, London, 1954.
9 Symposium on Chromatography, *Discussions Faraday Soc.*, 7 (1949) 239.
10 A. W. K. TISELIUS, *Endeavour*, 11 (1952) 5.
11 H. H. STRAIN UND G. W. MURPHY, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 50.
12 A. J. P. MARTIN UND R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 35 (1941) 1358.
13 A. J. P. MARTIN, *Ann. Rev. Biochem.*, 19 (1950) 517.
14 *Bull. soc. chim. France*, [5] (1951), Appendice.
15 D. H. R. BARTON, *Experientia*, 6 (1950) 316;
D. H. R. BARTON UND W. J. ROSENFELDER, *J. Chem. Soc.*, (1951) 1048.
16 D. H. R. BARTON, O. HASSEL, K. S. PITZER UND V. PRELOG, *Nature*, 172 (1953) 1096.
17 E. J. UMBERGER UND J. M. CURTIS, *J. Biol. Chem.*, 178 (1949) 265.
18 D. R. IDLER UND C. A. BAUMANN, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 623;
J. R. COFFMAN, *J. Biol. Chem.*, 140 (1941) xxviii.
19 E. B. TRICKEY, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 3474.
20 W. M. STOKES, F. C. HICKEY UND W. A. FISH, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 5174.
21 H. SILBERMAN UND S. SILBERMAN-MARTYNCEWA, *J. Biol. Chem.*, 165 (1946) 359.
22 H. R. KRAYBILL, M. H. THORNTON UND K. E. ELDRIDGE, *Ind. Eng. Chem.*, 32 (1940) 1138.
23 M. H. THORNTON, H. R. KRAYBILL UND F. K. BROOME, *J. Am. Chem. Soc.*, 63 (1941) 2079.
24 W. S. REICH, *Compt. rend.*, 208 (1939) 748; *Biochem. J.*, 33 (1939) 1000.
25 M. E. LOMBARDO, TH. A. VISCELLI, A. MITTELMANN UND P. B. HUDSON, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 353.
26 J. G. HAMILTON, Jr. UND R. T. HOLMAN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 36 (1952) 456.
27 T. REICHSTEIN UND C. W. SHOPPEE, *Discussions Faraday Soc.*, 7 (1949) 305.
28 H. BROCKMANN UND H. SCHODDER, *Ber.*, 74 (1941) 73.
29 G. HESSE, I. DANIEL UND G. WOHLLEBEN, *Angew. Chem.*, 64 (1952) 103.
30 T. K. LAKSHMANAN UND S. LIEBERMAN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 53 (1954) 258; *Federation Proc.*, 12 (1953) 235; *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 180.
31 E. DINGEMANSE, L. G. HUIS IN'T VELD UND S. L. HARTOGH-KATZ, *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 12 (1952) 66.
32 W. RITTEL, A. HUNGER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 434.
33 K. EIK-NES, D. H. NELSON UND L. T. SAMUELS, *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 13 (1953) 1280.
34 D. H. NELSON UND L. T. SAMUELS, *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 12 (1952) 519.
35 H. J. CAHNMANN, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 1307.
36 R. NEHER, unveröffentlichte Daten.
37 H. MAIER-HUSER, Soc. Laboratoires des Proxytases, Paris, *D.B.P.*, 956.096 (17.5.1952).
38 A. H. NATHAN, Upjohn & Co., Kalamazoo, *D.B.P.* 946.801 (1.9.1951).
39 H. LEVY UND ST. KUSHINSKY, *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 357.
40 S. G. JOHNSON, *Acta Endocrinol*, 21 (1956) 127, 146, 157.
41 I. R. COOK, S. R. STITCH, A. E. HALL UND M. P. FELDMAN, *Analyst*, 79 (1954) 24.
42 M. H. POND, *Lancet*, 261 (1951) 906.
43 K. DOBRINER, S. LIEBERMAN UND C. P. RHOADS, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 241.
44 B. L. RUBIN, H. ROSENKRANTZ, R. I. DORFMAN UND G. PINCUS, *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 13 (1953) 568.
45 M. L. SWEAT, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 1964.
46 W. J. HAINES UND J. N. KARNEMAAT, in D. GLICK, *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 1, Interscience, New York, 1954, p. 171.
47 E. HEFTMANN UND D. F. JOHNSON, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 519.
48 K. O. DONALDSON, V. J. TULANE UND L. M. MARSHALL, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 285.
49 F. GALINOVSKY UND O. VOGL, *Monatsh. Chem.*, 79 (1948) 325.
50 D. DANIEL, E. LEDERER UND L. VELLUZ, *Bull. soc. chim. biol.*, 27 (1945) 218.
51 C. W. SHOPPEE, *J. Chem. Soc.*, (1946) 1138.

52 E. LEDERER, F. MARX, D. MERCIER UND G. PÉROT, *Helv. Chim. Acta*, 29 (1946) 1354.
53 L. RUZICKA, V. PRELOG UND E. TAGMANN, *Helv. Chim. Acta*, 27 (1944) 1149.
54 O. WINTERSTEINER UND M. MOORE, *J. Am. Chem. Soc.*, 65 (1943) 1503, 1507.
55 A. v. CRISTIANI UND V. ECK, *Z. physiol. Chem.*, 280 (1944) 127.
56 V. PRELOG, L. RUZICKA UND P. STEIN, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 2222.
57 H. SCHÖN UND F. GEY, *Z. physiol. Chem.*, 303 (1956) 81.
58 L. VELLUZ, G. AMIARD UND A. PETIT, *Bull. soc. chim. France*, (1949) 501.
59 B. BORGSTRÖM, *Acta Physiol. Scand.*, 25 (1952) 111.
60 H. BRETSCHNEIDER, *Monatsh. Chem.*, 74 (1941) 53.
61 W. W. WELLS, D. L. COLEMAN UND C. A. BAUMANN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 57 (1955) 437.
62 N. H. CALLOW, *Biochem. J.*, 33 (1939) 559.
63 S. LIEBERMAN, D. K. FUKUSHIMA UND K. DOBRINER, *J. Biol. Chem.*, 182 (1950) 299.
64 R. V. BROOKS, W. KLYNE UND E. MILLER, *Biochem. J.*, 54 (1953) 212.
65 S. LIEBERMAN, K. DOBRINER, B. R. HILL, L. F. FIESER UND C. P. RHOADS, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 263.
66 J. VON EUW, A. LARDON UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 27 (1944) 1287.
67 J. VON EUW UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 25 (1942) 988.
68 O. SCHINDLER, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 1698.
69 J. ELKS UND C. W. SHOPPEE, *J. Chem. Soc.*, (1953) 241.
70 H. REICH, M. SUTTER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 23 (1940) 170.
71 R. B. MOFFETT UND W. M. HOEHN, *J. Am. Chem. Soc.*, 66 (1944) 2098.
72 J. VON EUW UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 24 (1941) 879.
73 T. REICHSTEIN UND J. VON EUW, *Helv. Chim. Acta*, 21 (1938) 1197.
74 T. REICHSTEIN UND C. MONTIGEL, *Helv. Chim. Acta*, 22 (1939) 1212.
75 H. REICH, S. J. SANFILIPPO UND K. F. CRANE, *J. Biol. Chem.*, 198 (1952) 713.
76 A. E. KELLIE UND A. P. WADE, *Biochem. J.*, 53 (1953) 582.
77 L. P. ROMANOFF, R. S. WOLF, M. CONSTANDSE UND G. PINCUS, *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 13 (1953) 928.
78 H. LEVY, R. W. JEANLOZ, R. P. JACOBSON, O. HECHTER, V. SCHENKER UND G. PINCUS, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 867.
79 A. S. MEYER, A. M. HAYANO, M. C. LINDBERG, M. GUT UND O. G. RODGERS, *Acta Endocrinol.*, 18 (1955) 148.
80 H. BRÄUNIGER, *Grundlagen und allgemeine Fragen der Papierchromatographie*, Volk und Gesundheit, Berlin, 1955.
81 J. SCHMIDLIN, G. ANNER, J. R. BILLETER, K. HEUSLER H. ÜBERWASSER, P. WIELAND UND A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 1438.
82 R. SCHOENHEIMER UND E. A. EVANS, Jr., *J. Biol. Chem.*, 114 (1936) 567.
83 M. KELLER, *Gynaecologia*, 136 (1953) 358.
84 J. B. BROWN, *Biochem. J.*, 60 (1955) 185.
85 K. MEYER, *Helv. Chim. Acta*, 29 (1946) 718.
86 A. AEBI UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 1013.
87 H. LICHTI, CH. TAMM UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 1933.
88 P. R. O. BALLY, K. MOHR UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 1740.
89 H. LICHTI, CH. TAMM UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 1914.
90 W. NAGATA, CH. TAMM UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 41.
91 O. SCHINDLER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 18.
92 A. HUNGER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 429.
93 J. J. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 183 (1950) 365.
94 O. SCHINDLER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 442.
95 A. UFFER, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 528.
96 H. R. URSCHELER, CH. TAMM UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 38 (1955) 883.
97 K. MEYER, *Pharm. Acta Helv.*, 24 (1949) 222.
98 H. A. WALENS, A. TURNER, Jr. UND M. E. WALL, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 325.
99 G. H. OTT UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 1799.
100 H. REICH UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 562.
101 E. SEEBECK UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 536.
102 CH. MEYSTRE, E. VISCHER UND A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 38 (1955) 381.
103 E. HEFTMANN, *Chem. Revs.*, 55 (1955) 679.
104 H. E. STAVELY, *J. Am. Chem. Soc.*, 63 (1941) 3127.
105 I. E. BUSH, *Brit. Med. Bull.*, 10 (1954) 229.
106 F. CRAMER, *Papierchromatographie*, 3. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, 1954.
107 H. HEUSSER, E. V. JENSEN, N. FRICK UND PL. A. PLATTNER, *Helv. Chim. Acta*, 32 (1949) 1326.
108 L. H. SARETT, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 (1948) 1454.
109 D. K. FUKUSHIMA, S. LIEBERMAN UND B. PRAETZ, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 5205.

110 J. A. KEVERLING BUISMAN, W. STEVENS UND J. VAN DER VLIET, *Rec. trav. chim.*, 66 (1947) 83.
111 A. BUTENANDT UND L. POSCHMANN, *Ber.*, 77 (1944) 392.
112 S. LIEBERMAN UND D. K. FUKUSHIMA, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 5211.
113 M. BERENSTEIN, A. GEORG UND E. BRINER, *Helv. Chim. Acta*, 29 (1946) 258.
114 W. TRAPPE, *Biochem. Z.*, 306 (1940) 316.
115 V. R. MATTOX UND H. L. MASON, *J. Biol. Chem.*, 223 (1956) 215.
116 L. RUZICKA UND V. PRELOG, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 975.
117 L. RUZICKA, P. MEISTER UND V. PRELOG, *Helv. Chim. Acta*, 30 (1947) 867.
118 R. J. BLOCK, E. L. DURRUM UND G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press, New York, 1955.
119 W. M. STOKES, *Arch. Biochem. Biophys.*, 67 (1957) 272.
120 J. H. LINFORD, *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 34 (1956) 1153.
121 L. H. GEVANTMAN, R. K. MAIN UND L. M. BRYANT, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 170.
122 J. E. PHILIP UND J. R. SCHENCK, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 170.
123 W. VOGT, *Chem.-Ingr.-Tech.*, 23 (1951) 580.
124 W. M. STOKES, W. A. FISH UND F. C. HICKEY, *J. Biol. Chem.*, 220 (1956) 415.
125 L. L. RAMSAY UND W. I. PATTERSON, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 29 (1946) 337.
126 O. CRÉPY, M. F. JAYLE UND F. MESLIN, *Acta Endocrinol.*, 24 (1957) 233.
127 J. J. BARLOW, *Biochem. J.*, 65 (1957) 34 P.
128 W. R. SLAUNWHITE, Jr. UND A. A. SANDBERG, *Arch. Biochem. Biophys.*, 63 (1956) 478.
129 A. STOLL, E. ANGLIKER, F. BARFUSS, W. KUSSMAUL UND J. RENZ, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 1460.
130 G. A. HOWARD UND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 46 (1950) 532.
131 A. STOLL UND W. KREIS, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 1431.
132 J. P. ROSSELET UND S. LIEBERMAN, *Federation Proc.*, 13 (1954) 284.
133 W. R. BUTT, P. MORRIS UND C. J. O. R. MORRIS, *Biochem. J.*, 49 (1951) 434.
134 W. S. BAULD, *Biochem. J.*, 63 (1956) 488.
135 H. HEGEDÜS, CH. TAMM UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 36 (1953) 357.
136 R. W. H. EDWARDS UND A. E. KELLIE, *Chem. and Ind.* (London), (1956) 250.
137 E. R. COOK, B. DELL UND D. J. WAREHAM, *Analyst*, 80 (1955) 215.
138 J. K. N. JONES UND S. R. STITCH, *Biochem. J.*, 53 (1953) 679.
139 S. A. SIMPSON, J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. VON EUW, O. SCHINDLER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 37 (1954) 1163.
140 W. DIRSCHERL, W. KERNS UND H. SCHRIEFERS, *Z. physiol. Chem.*, 305 (1956) 116.
141 J. F. NYC, D. M. MARON, J. B. GARST UND H. B. FRIEDGOOD, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 77 (1951) 466.
142 S. BERGSTRÖM UND J. SJÖVALL, *Acta Chem. Scand.*, 5 (1951) 1267.
143 F. A. VON METZSCH, *Angew. Chem.*, 68 (1956) 323.
144 H. BRAUNSBERG, M. I. STERN UND G. I. M. SWYER, *J. Endocrinol.*, 11 (1954) 189.
145 C. J. O. R. MORRIS UND D. C. WILLIAMS, *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology*, 8 (1955) 157.
146 H. FRITZ UND A. BAUER, *Chem.-Ingr.-Tech.*, 26 (1954) 609.
147 R. E. HARMAN, E. A. HAM, D. D. DE YOUNG, N. G. BRINK UND L. H. SARETT, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 5035.
148 E. H. MOSBACH, M. NIERENBERG UND F. E. KENDALL, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 2358.
149 W. J. HAINES, *Recent Progr. in Hormone Research*, 7 (1952) 255.
150 L. M. REINEKE, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1853.
151 C. J. O. R. MORRIS UND D. C. WILLIAMS, *Biochem. J.*, 54 (1953) 470.
152 W. TAYLOR, *Biochem. J.*, 56 (1954) 463.
153 R. I. COX UND G. F. MARRIAN, *Biochem. J.*, 54 (1953) 353.
154 C. J. O. R. MORRIS UND D. C. WILLIAMS, *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology*, 7 (1953) 261.
155 S. A. SIMPSON UND J. F. TAIT, *Mem. Soc. Endocrinol.*, No. 2 (1953) 9.
156 S. A. SIMPSON UND J. F. TAIT, *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology*, 8 (1955) 204.
157 D. F. JOHNSON, E. HEFTMANN UND A. L. HAYDEN, *Acta Endocrinol.*, 23 (1956) 341.
158 P. B. BAKER, F. DOBSON UND S. W. STROUD, *Nature*, 168 (1951) 114.
159 D. BANES, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 42 (1953) 669.
160 P. J. AYRES, O. GARROD, S. A. SIMPSON UND J. F. TAIT, *Biochem. J.*, 65 (1957) 639.
161 E. R. KATZENELLENBOGEN, K. DOBRINER UND TH. H. KRITCHEVSKY, *J. Biol. Chem.*, 207 (1954) 315.
162 K. DOBRINER, T. KRITCHEVSKY UND E. R. KATZENELLENBOGEN, *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 177 (Discussion).
163 G. I. M. SWYER UND H. BRAUNSBERG, *J. Endocrinol.*, 7 (1951) lx.
164 M. I. STERN UND G. I. M. SWYER, *Nature*, 169 (1952) 769.

165 J. BITMAN UND J. F. SYKES, *Science*, 117 (1953) 356.
166 E. O. HAENNI, J. CAROL UND D. BANES, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 42 (1953) 162.
167 L. BOSCH, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 301.
168 W. S. BAULD, *Biochem. J.*, 59 (1955) 294.
169 G. F. MARRIAN UND W. S. BAULD, *Biochem. J.*, 59 (1955) 136.
170 D. BANES UND J. CAROL, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 42 (1953) 674.
171 E. H. MOSBACH, C. ZOMZELY UND F. E. KENDALL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 48 (1954) 95.
172 J. SJÖVALL, *Acta Physiol. Scand.*, 29 (1953) 232.
173 S. BERGSTRÖM UND J. SJÖVALL, *Acta Chem. Scand.*, 8 (1954) 611.
174 A. NORMAN, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 1413.
175 A. NORMAN, *Acta Physiol. Scand.*, 32 (1954) 1.
176 G. R. SVOBODA UND L. M. PARKS, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 43 (1954) 584.
177 I. E. BUSH, *Biochem. J.*, 50 (1952) 370.
178 A. ZAFFARONI, *Recent Progr. in Hormone Research*, 8 (1953) 51.
179 L. R. AXELROD, *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 69.
180 K. SAVARD, *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 185.
181 I. E. BUSH, *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 321.
182 A. GRÜNE, *Chimia* (Switz.), 11 (1957) 173, 213.
183 R. CONSDEN, A. H. GORDON UND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
184 E. B. HERSHBERG, E. OLIVETO, M. RUBIN, H. STAEUDLE UND L. KUHLEN, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 1144.
185 R. H. LEVIN, B. J. MAGERLIN, A. V. MCINTOSH, Jr., A. R. HANZE, G. S. FONKEN, J. L. THOMPSON, A. M. SEARCY, M. A. SCHERI UND E. S. GUTSELL, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 546.
186 R. B. MOFFETT UND H. V. ANDERSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 747.
187 G. SLOMP, Jr., J. F. SHEALY, J. L. JOHNSON, R. A. DONIA, B. A. JOHNSON, R. P. HOLYSZ, R. L. PEDERSON, A. O. JENSEN UND A. C. OTT, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 1216.
188 E. OLIVETO, C. GEROLD UND E. B. HERSHBERG, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 6113.
189 E. S. ROTHMAN UND M. E. WALL, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 1744.
190 A. ZAFFARONI, R. B. BURTON UND E. H. KEUTMANN, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 109.
191 A. ZAFFARONI, R. B. BURTON UND E. H. KEUTMANN, *Science*, 111 (1950) 6.
192 M. L. QUAIFE, R. P. GEYER UND H. R. BOLLIGER, *Abstracts of papers, 130th Meeting Am. Chem. Soc.*, (1956).
193 E. KODICEK UND D. R. ASHBEY, *Biochem. J.*, 57 (1954) xii.
194 Ž. PROCHÁZKA, L. LÁBLER UND Z. KOTÁSEK, *Collection Czechoslov. Chem. Communs.*, 19 (1954) 1258.
195 R. P. MARTIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 408.
196 Č. MICHALEC, V. JIRGL UND J. PODZIMEK, *Experientia*, 13 (1957) 242.
197 Č. MICHALEC, *Naturwiss.*, 42 (1955) 509.
198 J. KUČERA, Ž. PROCHÁZKA UND K. VEREŠ, *Collection Czechoslov. Chem. Communs.*, 22 (1957) 1185.
199 F. MARKWARDT, *Arch. Pharm.*, 288 (1955) 82.
200 F. MARKWARDT, *Naturwiss.*, 41 (1954) 139.
201 TH. H. KRITCHEVSKY UND A. TISELIUS, *Science*, 114 (1951) 299.
202 D. KRITCHEVSKY UND M. R. KIRK, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4484.
203 C. GÜNZEL UND F. WEISS, *Z. anal. Chem.*, 140 (1953) 89.
204 P. KISS UND T. SZÉLL, *Naturwiss.*, 43 (1956) 448.
205 R. B. DAVIS, J. M. MCMAHON UND G. KALNITSKY, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4483.
206 H. SCHMIDT, H. J. STAUDINGER UND V. BAUER, *Biochem. Z.*, 324 (1953) 128.
207 H. SCHMIDT UND H. J. STAUDINGER, *Angew. Chem.*, 66 (1954) 711.
208 I. E. BUSH UND D. A. H. TAYLOR, *Biochem. J.*, 52 (1952) 643.
209 W. DIRSCHERL UND E. GERHARDS, *Acta Endocrinol.*, 19 (1955) 233.
210 R. NEHER UND A. WETTSTEIN, *J. Clin. Invest.*, 35 (1956) 800.
211 B. L. RUBIN, R. I. DORFMAN UND G. PINCUS, *J. Biol. Chem.*, 203 (1953) 629.
212 B. LEWIS, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 396.
213 R. NEHER UND A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 2278.
214 G. M. SHULL, J. L. SARDINAS UND R. C. NUBEL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 37 (1952) 186.
215 D. G. EDGAR, *Biochem. J.*, 54 (1953) 50.
216 F. MICHEEL UND H. SCHWEPPE, *Mikrochim. Acta*, (1954) 53; *Angew. Chem.*, 66 (1954) 136.
217 B. LEWIS, *J. Clin. Pathol.*, 10 (1957) 148.
218 E. VON ARX UND R. NEHER, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 1664.
219 G. OERTEL, *Naturwiss.*, 43 (1956) 18.
220 K. SAVARD, H. W. WOTIZ, P. MARCUS UND H. M. LEMON, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 6327.
221 B. L. RUBIN, R. I. DORFMAN UND G. PINCUS, *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 213.
222 N. A. DRAKE, W. J. HAINES, R. E. KNAUFF UND E. D. NIELSON, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 2036.

223 H. J. HÜBENER, E. HOFFMANN UND F. BODE, *Z. physiol. Chem.*, 289 (1952) 102.
224 W. J. HAINES UND N. A. DRAKE, *Federation Proc.*, 9 (1951) 180.
225 R. BERNASCONI, H. P. SIGG UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 38 (1955) 1767.
226 D. D. PERRIN, *Nature*, 178 (1956) 1244.
227 G. OERTEL, *Acta Endocrinol.*, 16 (1954) 263.
228 K. B. JENSEN, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 9 (1953) 99.
229 O. SCHINDLER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 108.
230 CH. D. KOCHAKIAN UND G. STIDWORTHY, *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 607.
231 L. R. AXELROD, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 173.
232 K. SAVARD., *J. Biol. Chem.*, 202 (1953) 457.
233 R. B. BURTON, A. ZAFFARONI UND E. H. KEUTMANN, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 763.
234 E. HEFTMANN, P. BERNER, A. L. HAYDEN, H. K. MILLER UND E. MOSETTIG, *Arch. Biochem. Biophys.*, 51 (1954) 329.
235 G. OERTEL, *Acta Endocrinol.*, 16 (1954) 267.
236 V. SCHWARZ, *Biochem. J.*, 53 (1953) 148.
237 P. J. AYRES, S. A. SIMPSON UND J. F. TAIT, *Biochem. J.*, 65 (1957) 647.
238 E. HEFTMANN, *Science*, 111 (1950) 571.
239 TH. E. WEICHSELBAUM UND H. W. MARGRAF, *J. Clin. Endocrinol.*, 17 (1957) 959.
240 J. BEYREDER UND H. RETTENBACHER-DÄUBNER, *Monatsh. Chem.*, 84 (1953) 99.
241 FR. JAMINET, *J. pharm. Belg.*, 7 (1952) 169.
242 C. DE COURCY, *J. Endocrinol.*, 14 (1956) 164.
243 E. HEFTMANN UND A. J. LEVANT, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 703.
244 B. J. ALDRICH, M. L. FRITH UND S. E. WRIGHT, *J. Pharm. and Pharmacol.*, 8 (1956) 1042.
245 A. B. SVENDSEN UND K. B. JENSEN, *Pharm. Acta Helv.*, 25 (1950) 241.
246 FR. JAMINET, *J. pharm. Belg.*, 6 (1951) 90.
247 E. HEFTMANN UND A. L. HAYDEN, *J. Biol. Chem.*, 197 (1952) 47.
248 R. TSCHESCHE, G. GRIMMER UND F. SEEHOFER, *Chem. Ber.*, 86 (1953) 1235.
249 D. KRITCHEVSKY UND M. R. KIRK, *Arch. Biochem. Biophys.*, 35 (1952) 346.
250 M. L. LEWBART UND J. J. SCHNEIDER, *Nature*, 176 (1955) 1175.
251 J. SJÖVALL, *Acta Chem. Scand.*, 8 (1954) 339.
252 J. SJÖVALL, *Acta Chem. Scand.*, 6 (1952) 1552.
253 R. KUHN UND J. LÖW, *Angew. Chem.*, 66 (1954) 639.
254 R. F. WITTER UND S. STONE, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 156.
255 C. HEUSGHEM, *Nature*, 171 (1953) 42.
256 A. GHILAIN, *Ann. endocrinol.* (Paris), 16 (1956) 477.
257 E. HABERMANN, W. MÜLLER UND A. SCHREGLMANN, *Arzneimittel-Forsch.*, 3 (1953) 30.
258 D. LAWDAY, *Nature*, 170 (1952) 415.
259 CH. SANNIÉ UND H. LAPIN, *Bull. soc. chim.*, (1952) 1080.
260 CH. SANNIÉ, S. HEITZ UND H. LAPIN, *Compt. rend.*, 233 (1951) 1670.
261 M. D. SIPERSTEIN, F. M. HAROLD, I. L. CHAIKOFF UND W. G. DAUBEN, *J. Biol. Chem.*, 210 (1954) 181.
262 H. ROSENKRANTZ, *Arch. Biochem. Biophys.*, 44 (1953) 1.
263 G. CAVINA, *Boll. soc. ital. biol. sper.*, 31 (1955) 1668.
264 CH. RIDDELL UND R. P. COOK, *Biochem. J.*, 61 (1955) 657.
265 J. M. MCMAHON, R. B. DAVIS UND G. KALNITSKY, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 75 (1950) 799.
266 L. R. AXELROD, *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 59.
267 R. NEHER UND A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 276.
268 G. T. BASSIL UND R. J. BOSCOTT, *Biochem. J.*, 48 (1951) xlviii.
269 W. J. MCALEER UND M. A. KOZLOWSKI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 66 (1957) 125.
270 G. BRANTE, *Nature*, 163 (1949) 651.
271 J. PROCHASKA, *Collection Czechoslov. Chem. Communs.*, 19 (1954) 98.
272 D. H. R. BARTON, *Nature*, 170 (1952) 250.
273 C. GÜNZEL UND F. WEISS, *Pharmazie*, 10 (1955) 725.
274 W. J. MCALEER UND M. A. KOZLOWSKI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 66 (1957) 120.
275 T. TSUKAMOTO, T. KAWASAKI, A. NARAKI UND T. YAMAUCHI, *J. Pharm. Soc. Japan*, 74 (1954) 1097.
276 M. FRÈREJAQUE UND M. DURGEAT, *Compt. rend.*, 236 (1953) 410.
277 W. J. MCALEER UND M. A. KOZLOWSKI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 62 (1956) 196.
278 R. TSCHESCHE UND R. PETERSON, *Chem. Ber.*, 87 (1954) 1719.
279 H. AUTERHOFF, *Arch. Pharm.*, 287 (1954) 380.
280 A. ZAFFARONI UND R. B. BURTON, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 749.
281 J. M. MANARO UND A. ZYGMUNTOWICZ, *Endocrinology*, 48 (1951) 114.
282 A. PUCK, *Klin. Wochschr.*, 33 (1955) 865.
283 J. A. CIFONETTI UND F. SMITH, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 1132.

284 J. BOUTE, *Ann. endocrinol.* (Paris), 14 (1953) 518.
285 F. L. MITCHELL UND R. E. DAVIES, *Biochem. J.*, 56 (1954) 690.
286 N. L. DUTTA, *Nature*, 175 (1955) 85.
287 H. SILBERMAN UND R. H. THORP, *J. Pharm. and Pharmacol.*, 5 (1953) 438.
288 K. WOLFF, *Pharmazie*, 10 (1955) 371.
289 E. BOJESEN, *Scand. J. Clin. & Lab. Invest.*, 8 (1956) 55.
290 W. S. RULIFFSON, H. M. LANG UND J. P. HUMMEL, *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 839.
291 L. L. SMITH UND S. J. STATER, *Texas Repts. Biol. and Med.*, 12 (1954) 543.
292 R. D. H. HEARD, R. JACOBS V. O'DONNELL, F. G. PERON, J. C. SAFFRAN, S. S. SOLOMON, L. M. THOMPSON, H. WILLOUGHBY UND C. H. YATES, *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 383.
293 D. L. BERLINER UND H. A. SALHANICK, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1608.
294 R. J. BOSCOTT, *Biochem. J.*, 51 (1952) xlv.
295 R. NEHER UND A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 2062.
296 N. J. HOLNESS, J. B. LUNNON UND C. H. GRAY, *J. Endocrinol.*, 14 (1956) 138.
297 A. E. KELLIE UND E. R. SMITH, *Nature*, 178 (1956) 323.
298 L. R. AXELROD, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 1308.
299 E. B. ROMANOFF UND CH. A. HUNT, *Endocrinology*, 57 (1955) 499.
300 I. E. BUSH, *Biochem. J.*, 59 (1955) xiv.
301 L. R. AXELROD, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 4074.
302 A. BODANSKY UND J. KOLONITSCH, *Nature*, 175 (1955) 729.
303 A. S. MEYER, *J. Org. Chem.*, 20 (1955) 1240.
304 J. ZANDER, H. SIMMER, A. M. v. MÜNSTERMANN UND E. MARX, *Klin. Wochschr.*, 32 (1954) 529.
305 W. J. NOWACZYNSKI, E. KOIW UND J. GENEST, *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 35 (1957) 425.
306 G. DIAZ, A. ZAFFARONI, G. ROSENKRANTZ UND C. DJERASSI, *J. Org. Chem.*, 17 (1952) 747.
307 H. A. WALENS, A. TURNER, Jr. UND M. E. WALL, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 325.
308 P. R. STEYERMARK UND W. J. NOWACZYNSKI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 59 (1955) 1.
309 W. J. NOWACZYNSKI UND P. R. STEYERMARK, *Arch. Biochem. Biophys.*, 58 (1955) 453.
310 W. J. NOWACZYNSKI UND P. R. SEYERMARK, *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 34 (1956) 592.
311 L. DORFMAN, *Chem. Revs.*, 53 (1953) 47.
312 W. J. MADER UND R. R. BUCK, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 666.
313 W. J. NOWACZYNSKI, M. GOLDNER UND J. GENEST, *J. Lab. Clin. Med.*, 45 (1955) 818.
314 D. ABELSON UND P. K. BONDY, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 922.
315 D. ABELSON UND P. K. BONDY, *Arch. Biochem. Biophys.*, 57 (1955) 208.
316 H. TAUBER, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 1494.
317 J. GREEN, *Biochem. J.*, 47 (1950) i.
318 C. C. PORTER UND R. H. SILBER, *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 201.
319 R. W. H. EDWARDS UND A. E. KELLIE, *Biochem. J.*, 56 (1954) 207.
320 E. M. RICHARDSON, J. C. TOUCHSTONE, F. C. DOHAN, H. BULASCHENKO, J. LANDOLT UND W. APPLIN, *J. Clin. Invest.*, 34 (1955) 285.
321 G. ARROYAVE UND L. R. AXELROD, *J. Biol. Chem.*, 208 (1954) 579.
322 R. B. BURTON, A. ZAFFARONI UND E. H. KEUTMANN, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 769.
323 R. NEHER, *International Symposium on Aldosterone* (Ed. A. F. MULLER AND C. M. O'CONNOR), Churchill, London, 1958, p. 11.
324 H. REICH, D. H. NELSON UND A. ZAFFARONI, *J. Biol. Chem.*, 187 (1950) 411.
325 J. F. NYC, J. B. GARST, H. F. FRIEDGOOD UND D. M. MASON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 29 (1950) 219.
326 C. H. HASSALL UND S. L. MARTIN, *J. Chem. Soc.*, (1951) 2766.
327 C. DE COURCY, I. E. BUSH, C. H. GRAY UND J. B. LUNNON, *J. Endocrinol.*, 9 (1953) 401.
328 M. FUJISAKI UND Y. ARAI, *Endocrinol. Japon.*, 3 (1956) 1.
329 CH. EGER, *Experientia*, 12 (1956) 37.
330 M. BEROZA, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1550.
331 A. C. PALADINI UND L. F. LELOIR, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 1024.
332 D. M. TENENT, J. B. WHITLA UND K. FLOREY, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1748.
333 E. M. RICHARDSON, J. C. TOUCHSTONE UND F. C. DOHAN, *J. Clin. Invest.*, 34 (1955) 285.
334 H. HOFMANN UND H. J. STAUDINGER, *Naturwiss.*, 38 (1951) 213.
335 H. HOFMANN UND H. J. STAUDINGER, *Biochem. Z.*, 322 (1952) 230.
336 J. C. TOUCHSTONE UND CHIEN TIEN HSU, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 1517.
337 F. L. MITCHELL, *Nature*, 170 (1952) 621.
338 R. J. BOSCOTT, *Chem. and Ind.* (London), (1952) 472.
339 R. J. BOSCOTT, *Biochem. J.*, 48 (1951) xlvii.
340 E. HEFTMANN, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 851.
341 I. E. BUSH UND A. A. SANDBERG, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 783.
342 S. MCDONOUGH, *Nature*, 173 (1954) 645.

343 A. ZAFFARONI, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 3828.
344 S. BERNSTEIN UND R. H. LENHARD, *J. Org. Chem.*, 18 (1953) 1146; 19 (1954) 1269.
345 G. M. SHULL, *Abstracts of Papers, 126th Meeting Am. Chem. Soc.*, (1954).
346 M. M. PECHET, *Science*, 121 (1955) 39.
347 W. R. EBERLEIN UND A. M. BONGIOVANNI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 59 (1955) 90.
348 W. J. NOWACZYNSKI UND E. KOIW, *J. Lab. Clin. Med.*, 49 (1957) 815.
349 E. H. SAKAL UND E. J. MERRILL, *Science*, 117 (1953) 451.
350 H. J. HUBENER, D. K. FUKUSHIMA UND T. F. GALLAGHER, *J. Biol. Chem.*, 220 (1956) 499.
351 V. R. MATTOX, H. L. MASON UND A. ALBERT, *J. Biol. Chem.*, 218 (1956) 359.
352 C. H. GRAY, M. A. S. GREEN, M. J. HOLNESS UND J. B. LUNNON, *J. Endocrinol.*, 14 (1956) 146.
353 H. S. BLOCH, B. ZIMMERMANN UND S. L. COHEN, *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 13 (1953) 1206.
354 R. NEHER, *Determination of Individual Adrenocortical Steroids, Advances in Clinical Chemistry*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1958, im Druck.
355 I. E. BUSH, Persönliche Mitteilung.
356 J. A. LUETSCHER, Jr., R. NEHER UND A. WETTSTEIN, *Experientia*, 10 (1954) 456; *J. Biol. Chem.*, 217 (1955) 505.
357 K. B. JENSEN, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 10 (1954) 69.
358 M. OKADA UND A. YAMADA, *J. Pharm. Soc. Japan*, 72 (1952) 933.
359 M. OKADA, A. YAMADA UND K. KOMETANI, *J. Pharm. Soc. Japan*, 72 (1952) 930.
360 G. VASTAGH UND J. TUZSON, *Pharm. Zentralhalle*, 92 (1953) 88.
361 H. SILBERMAN UND R. H. THORP, *J. Pharm. and Pharmacol.*, 6 (1954) 546.
362 R. TSCHESCHE UND F. SEEHOFER, *Chem. Ber.*, 87 (1954) 1108.
363 Y. SASAKAWA, *J. Pharm. Soc. Japan*, 74 (1954) 721.
364 P. MESNARD UND A. LAFARGUE, *Ann. pharm. franç.*, 12 (1954) 285.
365 E. SCHENKER, A. HUNGER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 37 (1954) 680.
366 R. MAULI, CH. TAMM UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 305.
367 FR. KAISER, *Chem. Ber.*, 88 (1955) 556.
368 G. J. RIGBY UND D. M. BELLIS, *Nature*, 178 (1956) 415.
369 J. P. RUCKSTUHL UND K. MEYER, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 1270.
370 CH. SANNIÉ UND H. LAPIN, *Compt. rend.*, 235 (1952) 581.
371 G. A. D. HASLEWOOD, *Biochem. J.*, 56 (1954) 581.
372 D. KRITCHEVSKY UND M. R. KIRK, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4731.
373 K. TONAKA UND K. TAKEDA, *J. Biochem.* (Japan), 39 (1952) 333.
374 J. SJÖVALL, *Arkiv Kemi*, 8 (1955) 299, 317.
375 S. ERIKSON UND J. SJÖVALL, *Acta Chem. Scand.*, 8 (1954) 1099.
376 J. J. SCHNEIDER UND M. L. LEWBART, *J. Biol. Chem.*, 222 (1956) 787.
377 H. A. NASH UND R. M. BROOKER, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 1942.
378 H. C. MURRAY UND D. H. PETERSON, *U.S. Pat.* 2,602,769 (1952).
379 TH. L. DAO, *Endocrinology*, 61 (1957) 242.
380 F. J. LOOMEIJER UND G. M. LUINGE, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 179.
381 B. CAMBER, *Clin. Chim. Acta*, 2 (1957) 188.
382 ST. DAL NOGARE UND J. MITCHELL, JR., *Anal. Chem.*, 25 (1953) 1376.
383 R. K. CALLOW, D. H. W. DICKSON, J. ELKS, R. M. EVANS, V. H. T. JAMES, A. G. LONG, J. F. OUGHTON UND J. E. PAGE, *J. Chem. Soc.*, (1955) 1966.
384 R. P. MARTIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 408.
385 H. SCHRÖTER, CH. TAMM, T. REICHSTEIN UND V. DELLOFEU, *Helv. Chim. Acta*, 41 (1958) 140.
386 G. CAVINA, *Rend. ist. super. sanità*, 20 (1957) 923.
387 H. DANIELSSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 401.
388 H. STRUCK, *Naturwiss.*, 45 (1958) 41.
389 F. J. RITTER UND J. HARTEL, *Nature*, 181 (1958) 765.

SOME FUNDAMENTAL ASPECTS OF CENTRIFUGALLY ACCELERATED PAPER CHROMATOGRAPHY*

HUGH J. McDONALD, LAWRENCE V. McKENDELL** AND EDWARD W. BERMES, JR.***

Department of Biochemistry, The Graduate School and Stritch School of Medicine, Loyola University, Chicago, Ill. (U.S.A.)

In recent publications from this laboratory, the technique of centrifugally accelerated paper chromatography has been described[1,2,3]. The apparatus employed consists essentially of a carefully balanced, motor driven, disk-shaped head, rotating in a horizontal plane, and inclosing a circular sheet of filter paper, held in position at the center. While rotating, the paper sheet assumes a taut, horizontal position. The solution to be fractionated is applied, by means of a micropipet, to the paper surface, in the form of dots or partial rings. While the disk is rotated at from 300 to 1000 r.p.m., the developing solution is added to the paper disk, at a point away from its

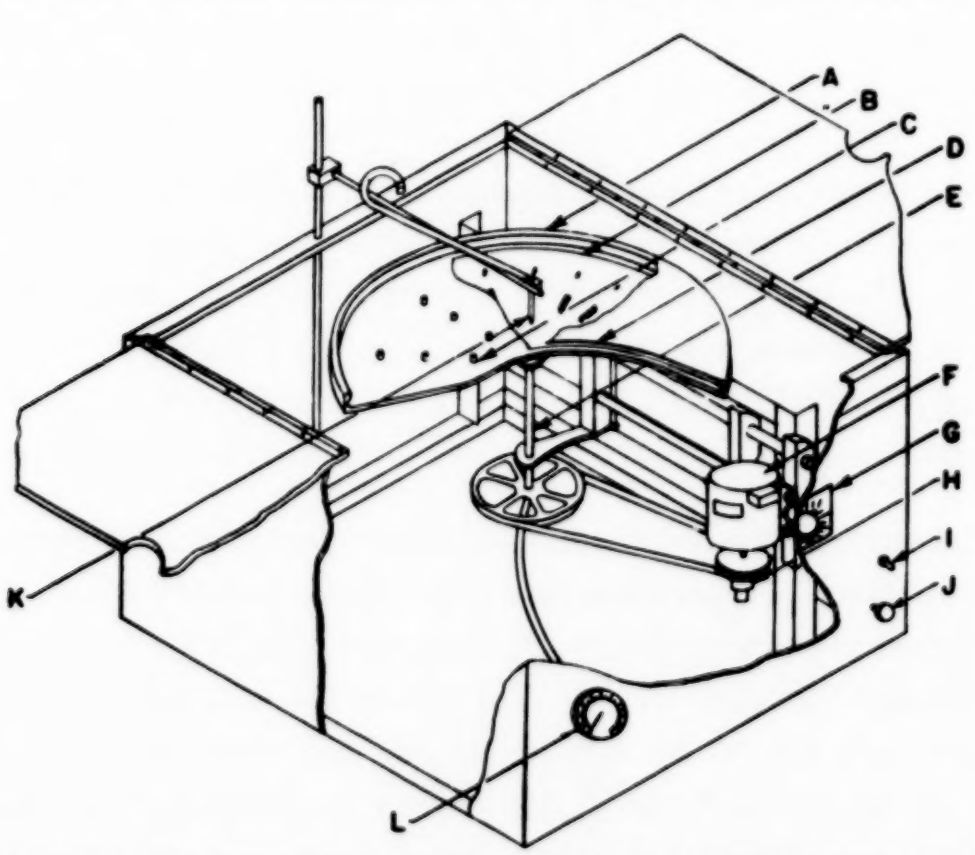


Fig. 1. Cut-away drawing of apparatus for centrifugally accelerated paper chromatography. A, rotor, outside diameter, 50 cm; B, circular paper sheet, 45 cm in diameter; C, pegs, to hold paper sheet away from lower inside surface of rotor; D, removable cover; E, rotor shaft; F, motor 1/6 horse power; G, combined variable speed control, 250–1000 r.p.m., and automatic timer; H, variable-pitch pulley to adjust speed of rotor; I, on-off switch; J, brake, for rapid stopping of rotor; K, micropipet for adding developing solution to paper sheet; L, tachometer, for reading r.p.m. of rotor.

* Supported in part by a grant-in-aid of research by the Chicago Heart Association.
** Tobacco Industry Research Committee Student Fellow, Summer, 1957.
*** Royal E. Cabell Fellow, 1957–1958.

References p. 265.

center, as a fine, continuous stream. In appearance, the developed chromatograms are not unlike those resulting from the classical circular paper method but the development time for an acceptable pattern is reduced markedly. The apparatus employed in these investigations is shown in Fig. 1.

The objective of this investigation was to explore the factors which are important in obtaining the best possible separations and the most reproducible chromatograms, and to study the variables which influence R_F values.

Materials

Whatman No. 1 filter paper cut to circular shape, 45 cm in diameter, from sheets 18¼ × 22½ inches; veronal buffer solution, pH 8.7, ionic strength 0.05; dye mixture of 2.0% bromphenol blue (BPB), 2.5% methyl orange (MeO) and 3.0% methyl red (MeR). All the experiments reported on in this paper were carried out at a temperature of approximately 26° C.

Rotational speed versus R_F values

In determining the effect of changes in the rotational speed of the rotor on R_F, 1 λ aliquots of the above dye mixture were placed on the circular sheet approximately 7.0 cm from its center. The veronal buffer was applied as a fine stream at a point

TABLE I

r.p.m.	R_F		
	BPB	MeR	MeO
364	0.86	0.64	0.22
480	0.86	0.63	0.22
600	0.86	0.64	0.23
742	0.86	0.64	0.21
866	0.85	0.61	0.21
925	0.85	0.61	0.20

approximately 5.0 cm from the center of the paper sheet, and at a rate of 1.15 ml/min, unless otherwise specified. To secure a flow rate of the buffer solution of 1.15 ml/min, a 5 λ pipet was used in conjunction with a helium pressure of 11.0 lb./in.^{2}.

The R_F of the dye mixture was determined at the following velocities; 364, 480, 600, 742, 866 and 925 r.p.m. At each velocity, the runs were terminated after a period of 7 min. As shown in Table I, there were no significant differences in the R_F values of the dyes at the various velocities. For a given component of the dye mixture, the mean deviation, expressed as per cent of the average of the R_F values for that component, at all measured rotational speeds, were computed to be 0.3, 2 and 4% for bromphenol blue, methyl red and methyl orange, respectively.

In the above operations, the solvent was continually added throughout the process. At a given velocity, however, if after the addition of a definite volum eof buffer, the flow of liquid is stopped and the spinning continued, the R_F values of the dyes decrease progressively. This may be illustrated in the following way. At 540

References p. 265.

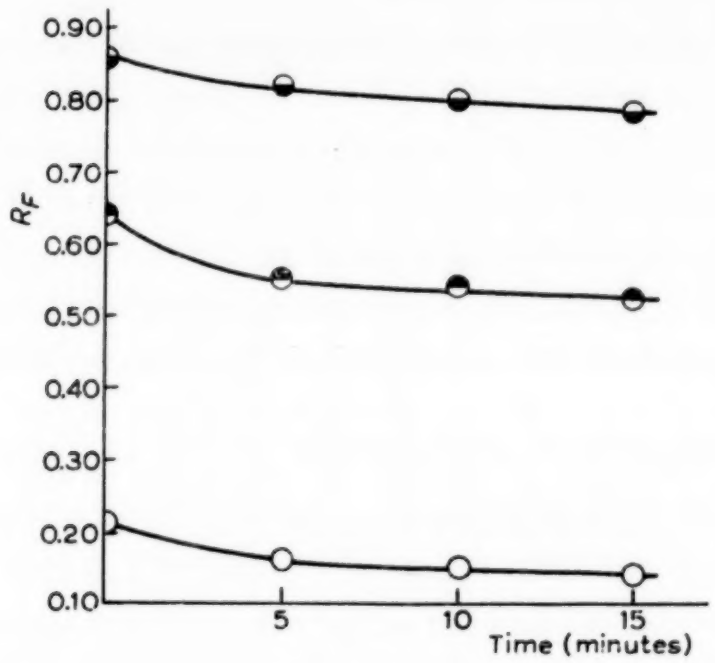


Fig. 2. R_F values of methyl orange (open circles), methyl red (circles, bottom half open) and bromphenol blue (circles, upper half open) plotted as a function of the time, in min, elapsing between the completion of the addition of 6.5 ml of buffer solution to the paper disk during a period of 5 min, and the stopping of the rotor.

r.p.m. the run was continued for periods of 5, 10 and 15 min after the addition of 6.5 ml of buffer (5 min at a flow rate 1.3 ml/min). From the data shown in Table II and Fig. 2, it is evident that there is a progressive decrease in R_F values in these time intervals.

Solvent flow rate versus R_F

The R_F values depend, in part, on the solvent flow rate. A flow rate of 1.3 ml/min was found to be too great for velocities below 300 r.p.m., adequate for velocities between 300–500 r.p.m. and satisfactory for velocities above 500. A flow rate of 1.15 ml/min is low enough to be used at all rotational speed above 250 r.p.m.

Using a flow rate of 1.3 ml/ min, at moderate and low velocities (300–500) (100–300) in which the run and the solvent flow are terminated at the same time, it was found

TABLE II

Time, min	*R_F values*		
	BPB	*MeR*	*MeO*
5	0.82	0.55	0.16
10	0.80	0.54	0.15
15	0.78	0.52	0.14

that the flow rate was such that the wetted area of the paper sheet continued to increase in size while drying. In such cases, the solvent front should be marked after drying rather than before or discrepancies in R_F values may result. If at these velocities the run is continued for approximately one minute, after cessation of solvent flow, the wetted area of the paper no longer continues to increase on stopping the rotor, but there may be a small difference in the R_F value, obtained under these conditions.

It is obvious therefore, that the ideal flow rate ought to be such that on stopping

References p. 265.

both the flow of solvent and the rotor, the perimeter of the wetted area does not increase appreciably on standing. At this flow rate the paper is said to be "minimally wet". At still higher flow rates, a flooding effect is obtained, that is, some of the water is sloshed across the surface of the paper, carrying the dyes along with it. On such chromatograms, this flooding effect is evident in the diffuse colored zones exhibited by the dyes. To obtain chromatograms with reproducible R_F values, the flow rate should be sufficiently low that the possibility of flooding is eliminated.

Grain of the paper versus chromatographic profile

The chromatograms that have been obtained are not circular in shape, as might have been expected, but elliptical. This elliptical outline was found to be related to the arrangement of the fibers in the paper. The R_F values of the separated dye components were found, within the limits of experimental error, to be the same whether the separation was carried out in a direction parallel to the long axis of the ellipse or at right angles to it.

Before cutting the rectangular sheets of Whatman No. 1 filter paper, lines were marked in the circle to be cut, parallel to the long sides of the paper sheets, that is, in the machine direction. In this way, it was possible to determine whether the elliptical pattern could be traced to some property of the paper or whether it was due, perhaps, to an imperfectly balanced rotor. It was found that, regardless of the velocity of rotation of the head, the major axis of the ellipse was always parallel to the long side of the original rectangular paper sheet. The ellipse was not altered to any great extent by pre-wetting the paper disk with solvent before adding the spot of dye mixture and the stream of developing liquid.

To confirm the observation that the flow rates are different in directions parallel to and at right angles to the machine direction of the filter paper, and that a non-circular pattern should therefore develop, strips were cut from the shorter and the longer sides of the original Whatman No. 1 filter paper sheets and were placed in identical, glass-covered cylinders containing the same amount of veronal buffer, and equilibrated in the same manner. At intervals of 3 and 6 min for an overall period of 1 hour, the height of buffer in the strips was measured. The height of the buffer was consistently higher in the strip cut from the longer side of the original paper sheet. The difference in height increased to a maximum of 1.1 cm after a period of approximately 40 min.

Factors affecting development

It has been observed that at higher velocities a more complete separation of the dyes was obtained, especially between methyl red and bromphenol blue, which at lower velocities and shorter runs, exhibit a zone of incomplete separation. For good separations, velocities of 500–700 r.p.m. are suggested, and at flow rates of 1.15 ml/min, the operation should last approximately 8 min. At these velocities and higher, the material to be separated may be placed closer to the center. This procedure results in a longer run which is another factor favoring better development. The point where

References p. 265.

the material to be separated is placed on the paper sheet is therefore of some importance in developing a good chromatogram.

Factors affecting wetness of paper

As mentioned earlier, the flow rate of solvent is of foremost importance in the development of satisfactory chromatograms. If the flow rate is too high for a particular velocity, a flooding effect is observed and when the run is stopped, the center of the

TABLE III

Velocity—540 r.p.m.	
Time, min	*Wetted area, cm²*
5	564
10	700
15	717
20	740

TABLE IV

Velocity, r.p.m.	*Wetted area, cm²*
370	668
482	687
600	725
742	737
866	744
980	740

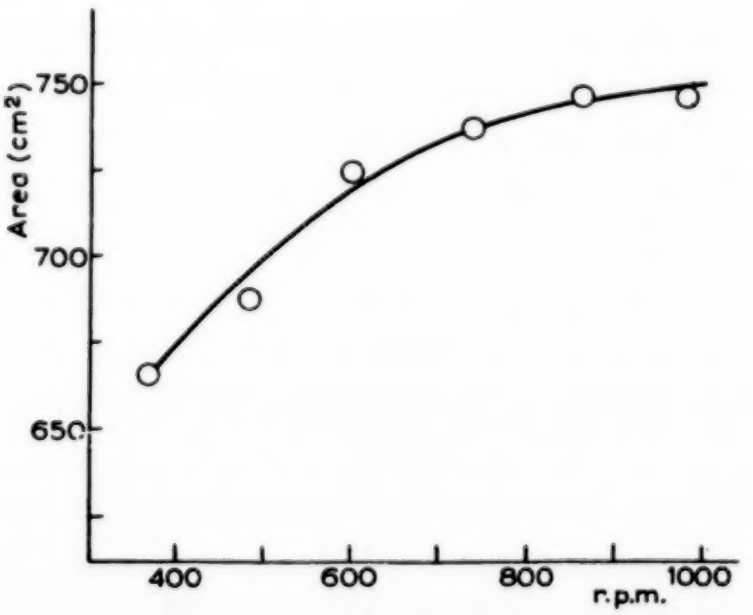


Fig. 3. The area of paper wetted by 8.05 ml of solvent applied during a run of 7 min, plotted as a function of the r.p.m. of the rotor.

paper may contain a shallow pool of water. From general considerations of this method of chromatography, one would expect that the amount of water per cm² would decrease with an increase in the distance of the particular area under observation from the center of the paper sheet. This conjecture was checked at a flow rate of 1.3 ml/min and 540 r.p.m.

By cutting out several pie-shaped sections of paper and dividing the sections into three parts along a radius of the original sheet, the conjecture was confirmed. Using this same method, it was found that if the solvent flow was stopped and the run continued, the water continues to move out in the form of a circular band of increasing diameter.

At 5 and 10 min, respectively, the concentration of water was greatest in the middle, then in the outer third, and eventually a relatively even wetness was obtained.

References p. 265.

It was also observed that the weight of water per cm^2 was greater along the long axis of the ellipse.

From the above observations, it may be concluded that for a given velocity and a given volume of liquid, the area wetted by the liquid increases rapidly with time up to a certain point and then tapers off. This is evident from the data in Table III. However, for the same volume of liquid, 8.05 ml, and the same length of run, 7 min, the area of the paper wetted by the liquid increases with velocity as is evident from the data in Table IV and from Fig. 3. The areas were measured by means of a Keuffel and Esser compensating polar planimeter, reading areas directly in square centimeters to 0.1 cm^2.

Effect of various filter papers on characteristics of the chromatograms

The question was raised as to the relative merits of different types of filter paper on the chromatographic separations. To answer this question, chromatograms were developed with the following filter papers: Eaton-Dikeman, No. 613, Schleicher and Schuell, No. 413, and with Cremer-Tiselius-Munktells chromatographic paper. A flow rate of 1.3 ml/min and a velocity of 600 r.p.m. were used in all experiments.

With Cremer-Tiselius-Munktells filter paper, sharply defined zones were obtained, but because of the thickness of the paper, a longer time was needed for adequate fractionation. Approximately 12 min were required for a separation which, with Whatman No. 1 paper, required only 7 min. The same type of elliptical outline was obtained as with Whatman No. 1.

With Eaton-Dikeman No. 613 filter paper, the elliptical outline was accentuated. The separations were not as clear and sharp as with Cremer-Tiselius-Munktells paper. This result may possibly be due to the fact that the flow rate was too high for this thickness of paper.

The Schleicher and Schuell filter paper gave a separation of the methyl orange component from the other components of the dye mixture, but bromphenol blue and methyl red were streaked as if following parallel grooves in the paper. The general outline of the solvent front was also elliptical, the major axis of the ellipse being parallel to the long axis of the original paper sheet and very irregular.

The R_F values of the dye mixture with these papers, except Schleicher and Schuell, were not markedly different from those determined with Whatman No. 1. With Schleicher and Schuell, the R_F of methyl orange was found to be 0.26, a figure which is significantly different from the rest. No R_F values of bromphenol blue and

TABLE V

	BPB	*MeR*	*MeO*
Whatman No. 1	0.86	0.64	0.22
Eaton-Dikeman No. 613	0.87	0.65	0.21
Cremer-Tiselius-Munktells	0.87	0.66	0.23
Schleicher and Schuell No. 413	—	—	0.26

References p. 265.

methyl red could be determined on this paper, because of the diffuseness of the zones on the chromatogram.

Separation of amino acids

To investigate the separation of a mixture of amino acids, organic solvents were employed. The solvent system used was butanol–glacial acetic acid–water, in the volume ratio 40:10:10, respectively. The amino acids leucine, methionine, and glycine were made up to 0.01 M in an aqueous solution and 5 λ aliquots were applied as spots to the paper. The zones on the chromatograms representing the various amino acids were developed by spraying the paper surface with a 0.2% by weight solution of ninhydrin in butanol (95% butanol and 5% 2 N acetic acid).

When early experiments showed that Whatman No. 1 filter paper did not yield adequately defined zones, Whatman-3MM paper was then employed. When the disk was rotated at a speed of 975 r.p.m., the Whatman-3MM paper gave zones which are sharply defined. It was found that solvent flow rates of 1.2 to 2.1 ml/min were satisfactory. The time of development was 15 min for a flow rate of 1.2 ml/min, and 7 min for a flow rate of 2.1 ml/min.

The R_F values obtained in the above experiments were found to be 0.85 for leucine, 0.56 for methionine, and 0.20 for glycine. In all experiments, the rotating head and the solvent flow were stopped at the same time. It was observed that the R_F values increased slightly with an increase in solvent flow rate, and that leucine, the leading component, exhibited the greatest change in R_F.

SUMMARY

A study has been made of some of the fundamental factors involved in obtaining good separations and reproducible chromatograms, with the technique of centrifugally accelerated paper chromatography. A study was also made of variables which might influence R_F values. Mixtures of bromphenol blue, methyl orange and methyl red were fractionated as well as solutions of leucine, methionine and glycine.

For the separation of the dyes, Whatman No. 1 filter paper was used with a veronal buffer solution of ionic strength 0.05 and having a pH of 8.7. For this system, it was found that the R_F values of the dyes were essentially unaffected by changes in rotational speed of the rotor from 300 to 925 r.p.m. It was found that the rate of addition of solvent was important in developing satisfactory chromatograms. A flow rate of 1.15 ml/min was found to be satisfactory at all rotational speeds above 250 r.p.m. The shape of the developed chromatogram was elliptical rather than circular, for all four types of paper which were studied. For Whatman No. 1, the major axis of the ellipse was parallel to the machine direction of the paper. The R_F values for the dye components were essentially the same for the following papers: Whatman No. 1, Eaton-Dikeman No. 613, and Cremer-Tiselius-Munktells.

The amino-acid mixture was fractionated using Whatman-3MM paper and a solvent system of butanol–glacial acetic acid and water, in the volume ratio 40:10:10, respectively. The disk was rotated at 975 r.p.m. With a solvent flow rate of 1.2 to 2.1 ml/min, sharply defined zones were obtained. The time of development was 15 min for a flow rate of 1.2 ml/min and 7 min for a flow rate of 2.1 ml/min. The R_F values obtained were 0.85 for leucine, 0.56 for methionine and 0.20 for glycine.

REFERENCES

1 H. J. McDONALD, E. W. BERMES AND H. G. SHEPHERD, *Naturwissenschaften*, 44 (1957) 9.
2 H. J. McDONALD, E. W. BERMES AND H. G. SHEPHERD, *Chromatog. Methods*, 2, No. 1 (1957) 1.
3 H. J. McDONALD AND L. V. McKENDELL, *Naturwissenschaften*, 44 (1957) 616.

Received November 2nd, 1957

TAURINE ET ACIDES AMINÉS DANS LA RÉTINE DES ANIMAUX

RADOVAN KUBÍČEK ET ANTONÍN DOLÉNEK

Institut de Chimie et Clinique d'Ophthalmologie de la Faculté de Médicine, Université Palacký, Olomouc (Tchécoslovaquie)

Au cours de travaux récents[1] nous avons constaté dans la rétine des Bovidés la présence d'une assez grande quantité de taurine—1.27% en moyenne dans l'organe sec.

Ayant admis que la présence de taurine n'est pas spécifique seulement pour la rétine de bétail, mais au contraire que la taurine joue un rôle général dans la biochimie de la rétine, nous avons étudié sa présence dans les rétines de plusieurs espèces d'animaux. En même temps, pour utiliser notre matière première nous avons étudié les acides aminés libres dans les rétines des animaux d'expérience.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons travaillé sur des rétines d'homme, de chat, de chien, de bovidés, de chèvre, de porc, de cheval, de lapin, de cobaye, de rat, de poule et de carpe. Les rétines d'animaux ont été isolées des yeux refroidis au plus tard 5 h après la mort de l'animal. La rétine d'homme a été utilisée quelques heures après la mort (matériel de dissection). On a dégagé les rétines de l'épithèle pigmenté, puis on les a homogénéisées en les broyant avec du sable de mer. Le matériel homogénéisé a été extrait à l'aide d'alcool éthylique à 80%. L'extraction terminée, (après 5 à 6 h), nous avons séparé les parties insolubles par centrifugation. L'alcool a été séparé de l'extrait par évaporation à une température peu élevée.

Les échantillons évaporés, dissous dans l'eau distillée, ont été purifiés par passage sur une colonne d'échangeur de cations (sous forme acide). Les ions métalliques et les acides aminés ont été retenus dans la colonne, tandis que la taurine est restée quantitativement dans la solution, que nous avons évaporée et analysée à l'aide de la chromatographie sur papier.

Nous avons utilisé la chromatographie descendante unidimensionelle sur papier Whatman No. 1 avec l'alcool butylique–acide acétique–eau (4:1:1) comme solvant, pendant 90 h.

Les acides aminés ont été élués de la résine à l'aide d'ammoniaque à 5%, concentrés par évaporation et chromatographiés sur papier au moyen du même solvant (méthode ascendante), le développement ayant été répété[2]. La détection a été faite par la ninhydrine. Les acides aminés tyrosine, thréonine, arginine, histidine, méthionine et lysine ont été déterminés par des méthodes spécifiques[3].

Bibliographie p. 268.

RÉSULTATS

Dans tous les cas examinés, nous avons trouvé, en employant la chromatographie sur papier, des quantités importantes de taurine tant dans les rétines de mammifères que dans celles d'oiseau et de poisson (Fig. 1). Comme nous n'avons eu qu'une

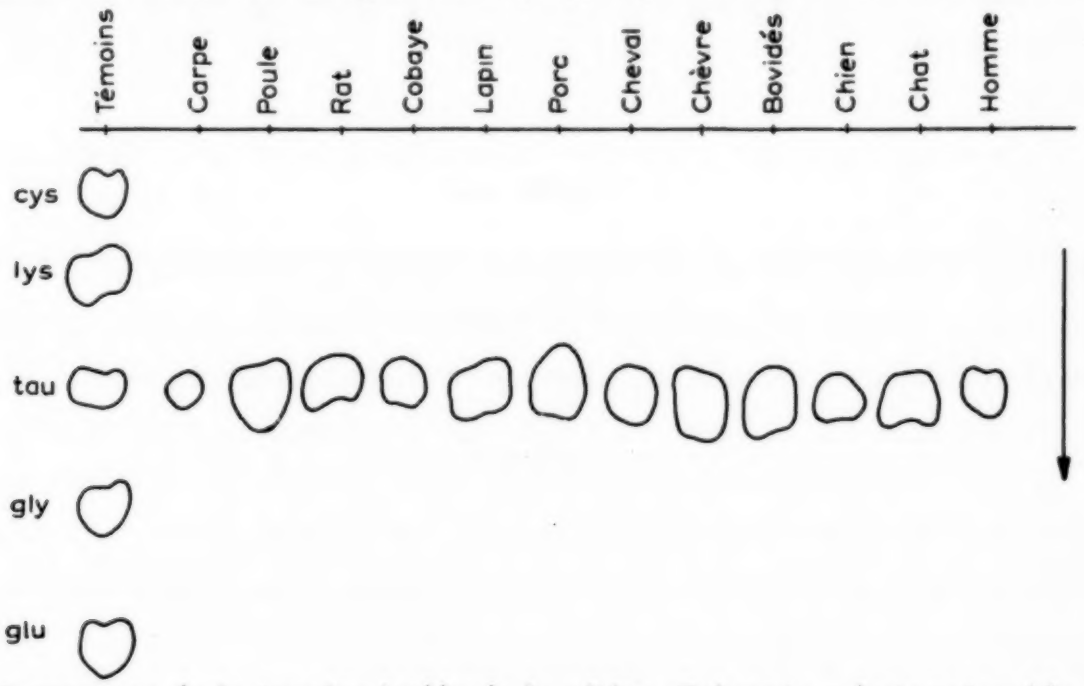


Fig. 1. Chromatogramme de la taurine isolée de la rétine. Solvant: *n*-butanol–acide acétique–eau (4:1:1) pendant 90 h.

quantité limitée de matière première, nous n'avons pu déterminer qu'approximativement la quantité de taurine dans les rétines de provenance différente, par rapport à la rétine des Bovidés (Fig. 1). Dans quelques cas nous avons obtenu la taurine sous forme cristalline.

Comparaison approximative de la quantité de taurine dans la rétine des animaux examinés

Homme	Chat	Chien	Bovidés	Chèvre	Cheval
+++	++++	++	++++	++++	+++
Porc	**Lapin**	**Cobaye**	**Rat**	**Poule**	**Carpe**
++++	++++	++	+++	++++	+

Par ailleurs, nous avons constaté dans les rétines des espèces examinées la présence constante des acides aminés suivants: leucine, isoleucine, phénylalanine, valine, acide γ-aminobutyrique, tyrosine, proline, acide glutamique, alanine, glycine, sérine, acide aspartique, lysine et cystéine. Précisons que la quantité relative des acides aminés ci-dessus est bien différente dans les rétines des différentes espèces, surtout pour la lysine, l'alanine et l'acide glutamique. En outre, la présence de traces d'ornithine, d'acide α-aminobutyrique, de thréonine, d'arginine, d'histidine et de méthionine a été constatée dans la rétine des Bovidés. L'acide γ-aminobutyrique prévalait avec de la taurine et de l'acide glutamique parmi les autres acides aminés.

DISCUSSION

AWAPARA a démontré dans ses travaux[5,6] sur la quantité de la taurine dans quelques organes de rats soumis à un régime alimentaire, que la concentration de celle-ci reste

Bibliographie p. 268.

bien constante. En même temps, il en a trouvé une relativement grande quantité dans les muscles et surtout dans le cœur. On sait que la taurine est le produit terminal de l'oxydation de la cystéine. Comme l'oxydation de la cystéine est accompagnée du developpement d'une relativement grande quantité d'énergie, il est bien possible, que ladite oxydation constitue dans certaines conditions la source d'énergie de l'organ. Dans ce cas, la taurine, comme produit de réaction, pourrait jouer le rôle de régulateur de la vitesse de la réaction.

RÉSUMÉ

Une relativement grande quantité de taurine a été trouvée dans les rétines des divers animaux.

SUMMARY

A relatively high quantity of taurine has been found in the retinas of various animals.

BIBLIOGRAPHIE

[1] R. KUBÍČEK ET A. DOLÉNEK, *Z. physiol. Chem.*, 308 (1957) 249.
[2] H. KIRBY BERRY, H. E. SUTTON, L. CAIN ET J. S. BERRY, *Univ. Texas Publ.*, No. 5109 (1951) 22.
[3] I. M. HAIS ET K. MACEK, *Papírová chromatografie*, Nakl. Česk. Akad. Věd., Praha, 1954, p. 181–184.
[4] A. DOLÉNEK, *Dissertation, Acta Univ. Olomuc.*, sous presse.
[5] J. AWAPARA, *J. Biol. Chem.*, 218 (1956) 571.
[6] J. AWAPARA, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 90 (1955) 435.

Reçu le 16 décembre 1957

A DIRECT METHOD OF DETERMINING SALICIN BY PAPER CHROMATOGRAPHY

ARNE PERSSON

Department of Botany, Royal School of Forestry, Stockholm (Sweden)

The identification of glucosides in plant materials is mainly carried out by isolating crystalline products, which can be determined by physical methods, and by hydrolysis according to the biochemical method of BOURQUELOT[1]. Neither method is especially rapid, though the latter has been considerably improved and simplified by employing the paper strip method of BLISS AND RAMSTAD[2]. CROOK AND STONE[3] identified salicin after enzymic hydrolysis, and the paper-chromatographic examination of cardiac aglycones by BUSH AND TAYLOR[4] included hydrolysis with sulphuric acid. NORKRANS[5] has described a turbidimetric method of determining the activity of β-glucosidase.

During investigations on resistance problems in hybrid aspen, *Populus tremula* × *Populus tremuloides*, and the parent species it was necessary to isolate and identify the glucoside salicin in healthy hybrid aspen and in trees attacked by a destructive fungus *Valsa nivea* Fr. The indirect method according to BLISS AND RAMSTAD, which involves hydrolysis of the salicin with emulsin to yield glucose and benzyl alcohol, was found tedious.

On searching for a more rapid method, the observation made by JOWETT AND POTTER[6] that salicin melted at 200° gave a red colour with sulphuric acid, was adapted and developed as described below.

EXPERIMENTAL

Aqueous solutions of salicin purum of different concentrations were placed on Whatman No. 1 filter paper and allowed to ascend in a 4:1:5 butanol–acetic acid–water solvent for 16 h at room temperature. After drying, the paper was sprayed with 2 *N* sulphuric acid and dried a second time using a thermo-desiccator AEG PL 247346. On heating the paper with the desiccator to 75–80°, the salicin appears as distinct pink spots after 1–2 min. The R_F value from a run in the solvent mentioned above is 0.57. In ethyl acetate–acetic acid–water (60:17:17.5) the R_F value is 0.86.

An attempt was made to obtain information about the quantitative values of the developed spots. The transmission of light was measured with a densitometer EEL X. 110. The optical density of paper and spot was determined at stated distances from the starting point of the chromatogram, and the values obtained were plotted graphically. The filter paper Whatman No. 1 served as a blank. The density values from Fig. 1 were transformed planimetrically to the curve represented in Fig. 2.

References p. 270.

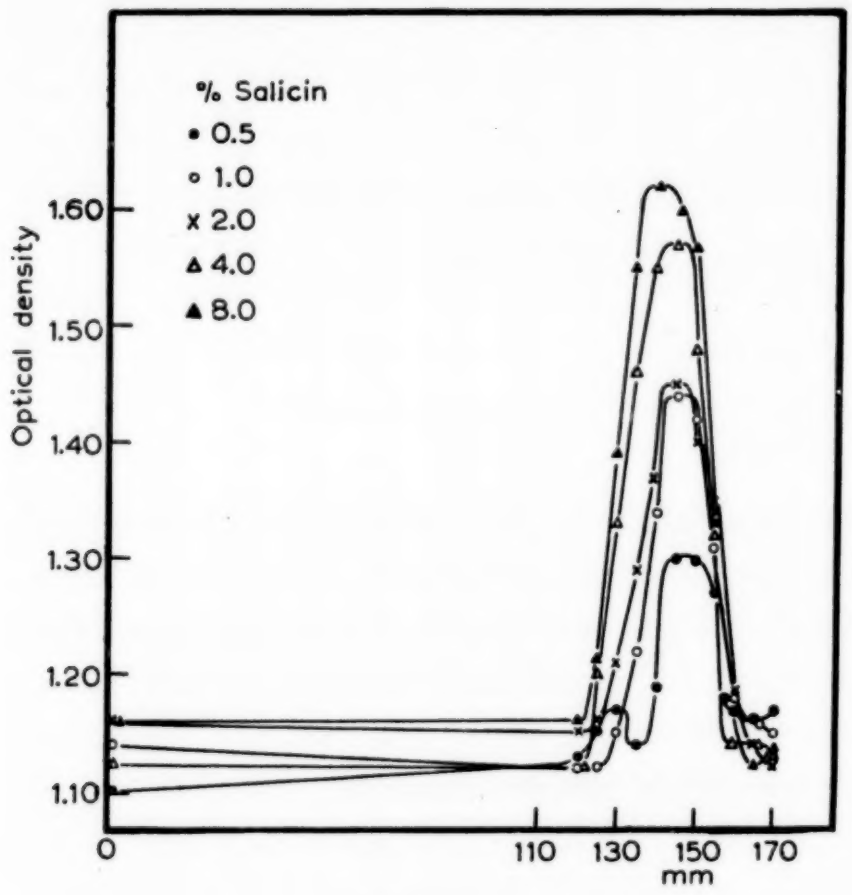


Fig. 1.

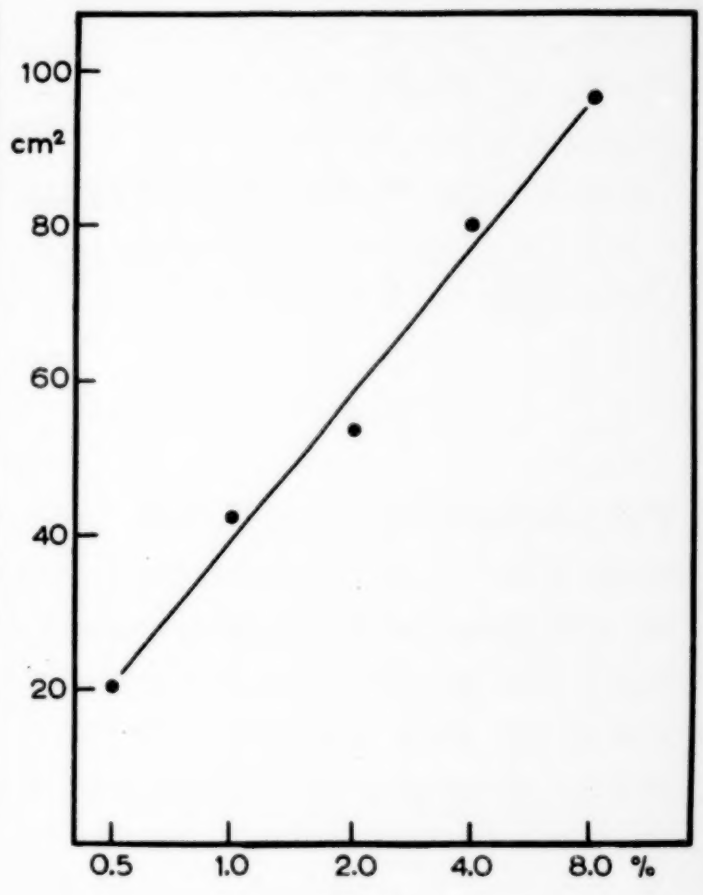


Fig. 2.

Fig. 1. Optical density of salicin at different concentrations.
Fig. 2. The spots of salicin in a chromatogram determined planimetrically.

As can be seen in Fig. 1 there is a rough accordance between the concentration of salicin and the optical density. This accordance is more pronounced when the concentrations are ascertained planimetrically. The method described may be used as a semi-quantitative one, but it must mainly be regarded as qualitative.

One disadvantage in using 2 *N* H_2SO_4 was observed. The ageing paper becomes very brittle and must be handled within a few hours after spraying. For preservation broad strips of tape are suitable.

SUMMARY

A semi-quantitative method of determining salicin by paper chromatography is reported. By using 2 *N* H_2SO_4 as a spraying reagent and heating with a thermo-desiccator salicin appears as distinct pink spots.

REFERENCES

1 K. PAECH AND M. V. TRACEY, *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. II, Springer-Verlag, Berlin, 1955.
2 C. A. BLISS AND E. RAMSTAD, *J. Am. Pharm. Assoc.*, 42 (1952) 348.
3 E. M. CROOK AND B. A. STONE, *Biochem. J.*, 65 (1957) 1.
4 I. E. BUSH AND D. A. H. TAYLOR, *Biochem. J.*, 52 (1952) 643.
5 B. NORKRANS, *Physiol. Plantarum*, 10 (1957) 454.
6 H. A. D. JOWETT AND C. E. POTTER, *Pharm. J.*, (1902) 157.

Received November 29th, 1957

ZUR WASSERAUFNAHME VON AKTIVEM ALUMINIUMOXYD*

GÜNTHER WOHLLEBEN

Chemisches Laboratorium der Fa. M. Woelm, Eschwege (Deutschland)

Das sehr hygroskopische, kristallisierte γ-Aluminiumoxyd ist heute eines der in der Chromatographie meist verwendeten Adsorptionsmittel. Zur Vermeidung katalytischer Umwandlungen oder zur Erzielung breiterer Zonen usw. wird es oft durch Zufügen bestimmter Gewichtsprozente Wasser desaktiviert[1]. Hierbei wird zwischen einigen zunächst sehr feuchten Körnerklumpen und anderen noch praktisch wasserfreien Körnern in kurzer Zeit durch isotherme Destillation ein Ausgleich im Wassergehalt erzielt, so dass nach mehrstündigem Stehen diese Oxyde chromatographisch reproduzierbar einsatzbereit sind.

Wir fragten uns nun, ob eine Vorratshaltung von auf diese Weise desaktivierten Aluminiumoxyden auch für praktisch unbegrenzte Zeit möglich ist, bzw. ob mit einer Umlagerung im System Aluminiumoxyd–Wasser gerechnet werden muss.

Verschiedene Autoren, insbesondere der Arbeitskreise von DE BOER[2], EUCKEN[3], GLEMSER[4], KIPLING[5], MILLS[6] und PAPÉE[7], haben bereits darauf hingewiesen, dass bei der Einwirkung von Wasser auf γ-Aluminiumoxyd Chemisorption und physikalische Adsorption gleichzeitig auftreten.

Neben der Bildung von Monohydrat (γ-AlO·OH, Böhmit) und sogar direkt von Trihydrat (γ-$Al(OH)_3$, Bayerit) wird Wasser durch Van der Waals'sche Kräfte adsorbiert, wobei auch Alterungserscheinungen denkbar sind, wie sie von WILLSTÄTTER[8] bei Tonerdehydrogelen untersucht wurden.

Da bei der üblichen Wasserbestimmung durch Ausglühen Hydratwasser und adsorbiertes Wasser nur zusammen ermittelt werden, versuchten wir, die Karl-Fischer-Lösung zur Bestimmung des Anteils an adsorbiertem Wasser in den verschiedenen, desaktivierten Aluminiumoxyden heranzuziehen. Diese Methode wurde bereits von WIELE[9] bei der Bestimmung des geringen Restwassers in α-Aluminiumoxyd benutzt. Wir titrierten die Oxyd-Proben innerhalb 30 min nach der Einwaage in absolutem Methanol**. Nach Vorversuchen hatte hierbei ein Tonerdehydrat (Bayerit) weniger als 0.1% titrierbares Wasser. Wir versetzten nun Aluminiumoxyd Woelm in seinen drei Oberflächenpräparierungen basisch, neutral und sauer (alle Ausgangsaktivität I) mit verschiedenen Mengen Wasser, wie sie zur Erzielung der angenäherten Aktivitätsstufen II–V nach BROCKMANN UND SCHODDER[10] von HESSE, DANIEL UND WOHLLEBEN[1] benutzt werden. Fig. 1 zeigt die mit Karl-Fischer-Lösung gefundenen Mengen freien Wassers.

---

* Vortrag auf der Hauptversammlung der Gesellschaft Deutscher Chemiker in Berlin am 7.10.1957.

** Längere Behandlung mit abs. Methanol ergab nur unbedeutend erhöhte Werte.

Literatur S. 273.

Die obere Kurvenschar gibt die mit Karl-Fischer-Lösung gefundene Wassermenge an; die Lagerungszeit bei dieser Versuchsreihe betrug knapp einen Monat. Die darunter befindliche Kurvenschar gibt ebenfalls für die drei verschiedenen Oberflächenpräparierungen die titrierbaren Wassermengen an, aber nach einer Lagerungszeit von fast fünf Jahren. Die ausgezogene oberste Linie zeigt den Gesamtwassergehalt, der sich aus dem in Al_2O_3 der Aktivität I mit etwa 0.3% gefundenem Wasser und den zugegebenen Wassermengen (d.h. 3, 6, 10 bzw. 15%) zusammensetzt.

Bei der unteren Versuchsreihe ist die Aktivität I nicht mit aufgeführt, da diese Reihe aus ganz anderen Gründen aufbewahrt wurde und die Ausgangsmaterialien

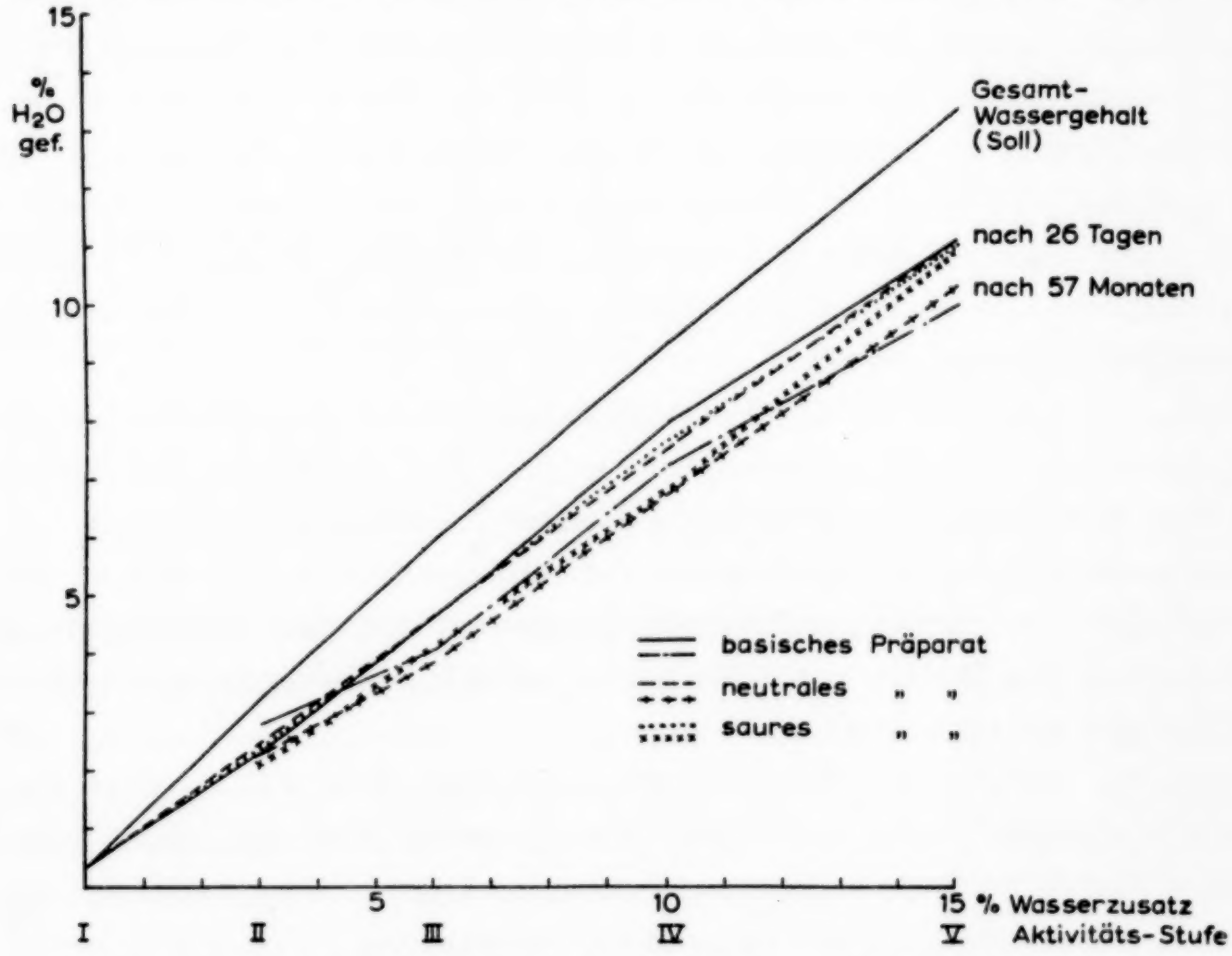


Fig. 1. In Al_2O_3 Woelm mit Karl-Fischer-Lösung titrierbares Wasser.

der Aktivität I bei der Messung nicht mehr zur Verfügung standen. Nach der Kurvenneigung ist aber anzunehmen, dass sich die Ausgangsaktivität I ebenfalls um einen Wassergehalt von etwa 0.3% bewegte.

Wenn man für die einzelnen Aktivitäten dieser beiden Versuchsreihen den Prozentgehalt an wiedergefundenem Wasser ermittelt, so finden sich für die Reihe mit fast einmonatiger Lagerung Werte von 74–83%, während bei der Reihe mit fast fünfjähriger Lagerung die wiedergefundenen Werte sich zwischen 67 und 78% bewegen. Aus der Neigung dieser Kurvenscharen ist unschwer zu erkennen, dass der Prozentsatz an nicht wiedergefundenem Wasser bei allen Aktivitätsstufen und allen Lagerungszeiten etwa gleich gross ist. Auch die Oberflächenpräparierungen unterscheiden sich praktisch nicht. Bei der Reihe mit langer Lagerungszeit dürften die grösseren Differenzen der Messwerte darauf zurückzuführen sein, dass die Fläschchen mit den für andere Zwecke vorgesehenen Substanzen in der Zwischenzeit gelegentlich geöffnet wurden; ausserdem könnte hier evtl. die Einwaage an zugegebenem Wasser

Literatur S. 273.

nicht so exakt gewesen sein wie bei der Reihe mit kurzer Lagerungszeit.—Es ist nicht so, dass die aktivsten Aluminiumoxyde, also etwa die Stufe II, prozentual mehr Wasser einlagern als die reichlich mit Wasser versehenen Stufen IV oder V. Zwischen adsorbiertem Wasser und zur Rehydratation verbrauchtem Wasser scheint sich ein Gleichgewicht einzustellen.

TABELLE I

ADSORPTIONS-WASSERGEHALTE IN Al_2O_3 WOELM, SAUER, AKT. III, DAS 6.0% GESAMT-WASSER ENTHÄLT

Lagerungszeit	*% H_2O gef.*	*% H_2O wiedergefunden*
0.2 h	5.4	90
2 h	5.2	87
48 h	4.9	82
26 Tage	4.7	78
57 Monate	4.1	68

Wie aus Tabelle I hervorgeht, erfolgt der Abfall von Teilen adsorbierten Wassers zu Gunsten des zur Rehydratation verbrauchten Wassers im Anfang sehr schnell, und mit weiterer Lagerungszeit ist nur noch mit geringen Verlusten an adsorbiertem Wasser zu rechnen. Bereits zwölf Minuten nach Zugabe des Wassers ist bei dem Aluminiumoxyd der Aktivität III ein Titrations-Verlust von 10% Wasser eingetreten, der nach insgesamt zwei Stunden Lagerung sich nur auf 13% erhöht. Chromatographische Vergleichsversuche mit dem von BROCKMANN UND SCHODDER[10] angegebenem Testgemisch Sudanrot/Sudangelb ergaben bei einer Messung der Gesamtzonenlänge bei Aktivität IV der drei verschiedenen Oberflächenpräparierungen die gleiche Zonenlänge bei Präparaten mit 2 Stunden oder 7.5 Monaten Lagerungszeit; nach 64 Monaten war die Zonenlänge bei einer Oberflächenpräparierung genau so lang, bei einer etwas kürzer und bei der dritten etwas länger.—Die Al_2O_3-Körner hatten bei allen Versuchen eine Grösse von etwa 20–100 μ. Die Lagerung erfolgte stets bei Raumtemperatur und normalem Druck.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde festgestellt, dass bei chromatographischen Arbeiten die Lagerung bereits desaktivierter Aluminiumoxyde ohne praktischen Einfluss ist. Eine Mindest-Lagerungszeit von 2 Stunden sollte jedoch beibehalten werden, auch, um die bei der Wasserzugabe auftretende starke Wärmetönung wieder abklingen zu lassen. Die Karl-Fischer-Titration kann aber nur unter Berücksichtigung des für die Rehydratation verbrauchten Wassers zur Aktivitätsbestimmung chromatographischer Aluminiumoxyde herangezogen werden.

SUMMARY

Storage of alumina has no influence on its behaviour in chromatography. However, a minimum storage time of two hours should be allowed after addition of the required amount of water for deactivation. When using the Karl-Fischer titration method for the determination of the chromatographic activity of aluminium oxides, the quantity of water used for rehydration must be taken into consideration.

LITERATUR

[1] G. HESSE, I. DANIEL UND G. WOHLLEBEN, *Angew. Chem.*, 64 (1952) 103.
[2] J. H. DE BOER UND G. M. M. HOUBEN, *Angew. Chem.*, 64 (1952) 563.
[3] A. EUCKEN, *Naturwissenschaften*, 34 (1947) 374.
[4] O. GLEMSER UND G. RIECK, *Angew. Chem.*, 68 (1956) 182.
[5] J. J. KIPLING UND D. B. PEAKALL, *J. Chem. Soc.*, (1957) 834.
[6] G. A. MILLS, S. WELLER, S. G. HINDIN UND T. H. MILLIKEN, *Z. Elektrochem.*, 60 (1956) 823.
[7] D. PAPÉE UND R. TERTIAN, *Compt. rend.*, 236 (1953) 1668.
[8] R. WILLSTÄTTER, H. KRAUT UND O. ERBACHER, *Ber.*, 58 (1925) 2448.
[9] H. WIELE, *Angew. Chem.*, 67 (1955) 126.
[10] H. BROCKMANN UND H. SCHODDER, *Ber.*, 74 (1941) 73.

Eingegangen den 10. Dezember 1957

INORGANIC ADSORPTION PAPER CHROMATOGRAPHY

W. F. PICKERING

N. S. W. University of Technology, Newcastle College, Tighes Hill (Australia)

The pioneering work of SCHOENBEIN who studied the movement of inorganic salt solutions along strips of paper has developed into the modern technique of inorganic paper chromatography. The many complex factors which are involved in the separation of inorganic compounds by this technique were discussed by POLLARD AND MCOMIE[1].

One important consideration is the role of the paper. As well as being a convenient mode of support for a fixed liquid phase, the paper may influence the distribution of ions by direct participation in the equilibrium processes. Several mechanisms have been proposed to explain the behaviour of the paper.

A useful hypothesis is that of HANES AND ISHERWOOD[2] who suggested that imbibed water molecules become linked to the paper in the form of a water–cellulose complex. Solute molecules and polar solvents may then compete with water for a position in this cellulose complex. BURMA[3] regards the distribution of a solute between the "non-solvent water" (*i.e.* water chemically bound to cellulose) and free adsorbed water as an adsorption process.

Other workers[4,5,6] have attributed the adsorption of cations by paper to ion exchange. It is suggested that the ions of a solute exchange with the ions of Na, K, Ca, Mg etc. which may be found on paper bound to carboxyl groups, silicates and other insoluble material.

Experimental evidence for some of the theories is limited and hence this study has been initiated. This paper records the results of a chromatographic investigation of the movement of cations using aqueous solvents of different pH values.

PROCEDURE

Spots of approximately 0.02 ml of either molar or deci-molar solutions of the nitrates of twelve common cations were placed near one edge of rectangular strips of Whatman No. 1 Filter Paper. These paper strips were suspended in enclosed glass vessels with the "spotted" end dipping into the developing solution.

Solutions of pH 1, 4, 7, 10 and 13 were prepared by adding either nitric acid or sodium hydroxide to distilled water and a constant ionic strength of 0.1 was maintained by the addition of potassium nitrate.

These solutions were used as the developing media for the series of chromatograms. After the liquid had ascended to a chosen height, the papers were removed

References p. 278.

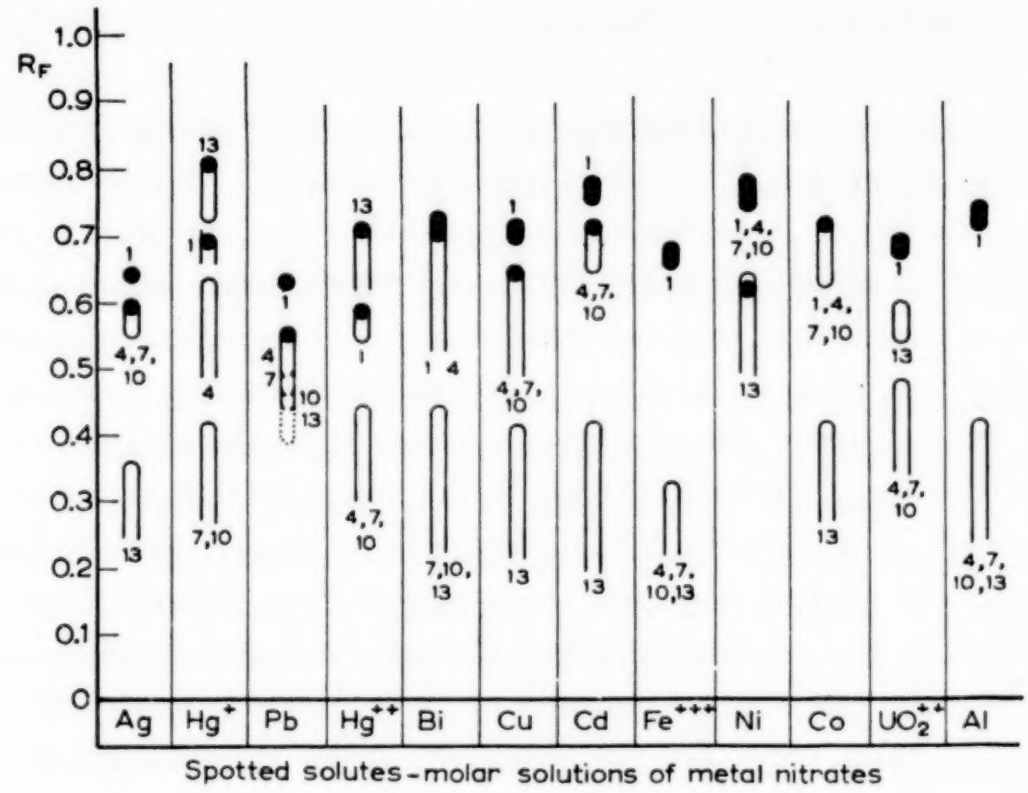


Fig. 1

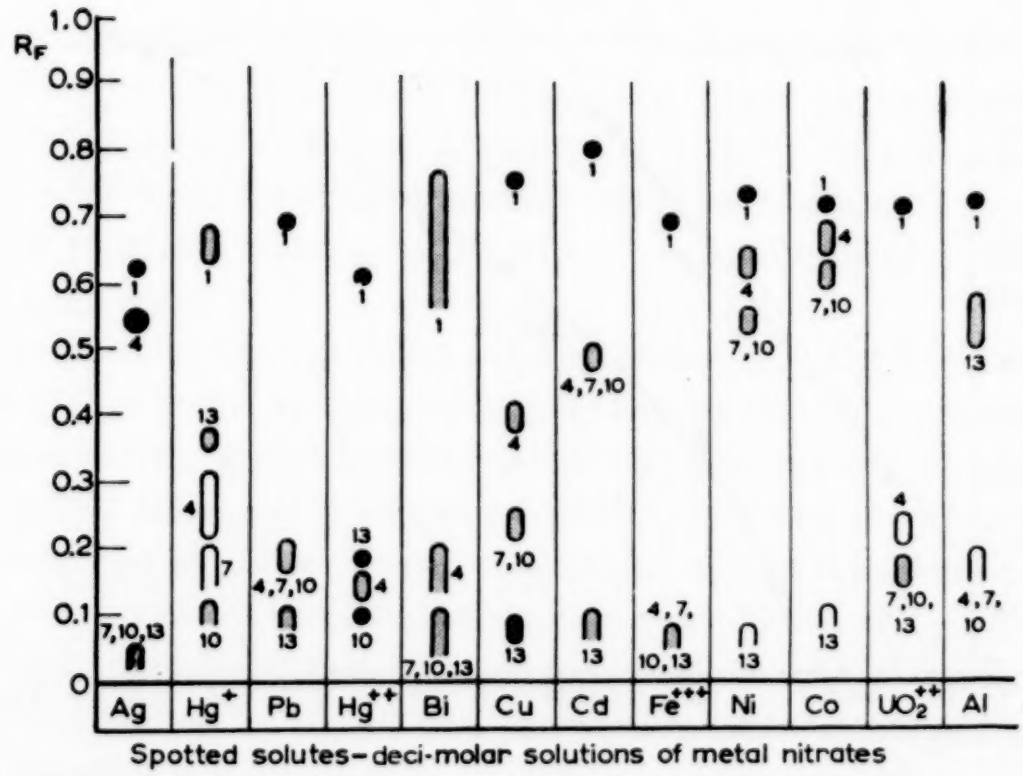


Fig. 2

Figs. 1 and 2. Movement of cations in aqueous solutions. The size of the symbols ●, ≡ etc. represents the relative increase in the area of the original spot during development. Tailing back to the starting line is shown by an opening at the lower edge, ⌶. A localised concentration of cation is shown by a darkened area within an elongated zone, ⌶. With elongated areas, the leading edge indicates the approximate R_F of the centre of the most concentrated zone. The numerals 1, 4, 7, 10 and 13 indicate the pH of the solvents used.

References p. 278.

and the cations were located by exposure to H_2S or treatment with some other suitable reagent.

In many cases the cations diffused over a wide area of paper and there was often tailing from the original spot. This effect was most marked when molar salt solutions were spotted on the paper. A symbolic representation of the results is shown in Figs. 1 and 2. The smallest circles on these figures represent spots which did not increase to more than five times their original size during development. An enlarged symbol of double or triple this area illustrates that the solute diffused into an area approximately ten or fifteen times (respectively) greater than the original spot. Elongated symbols designate tailing and where this tailing extended to the original spot, the lower edge of the symbol has been left unclosed. With molar "spots", cations became concentrated near the leading edge and this is shown by a darkened area in this zone. Because of the tailing and general diffusion, accurate calculation of R_F values was not possible and hence the relative movements of the cations indicated in Figs. 1 and 2 are of comparative value only. The numerals shown on these diagrams represent the pH values of the solvents responsible for the movement.

In a second series of tests, strips of filter paper were dipped into solutions containing varying concentrations of nitric acid or sodium hydroxide. After the liquid

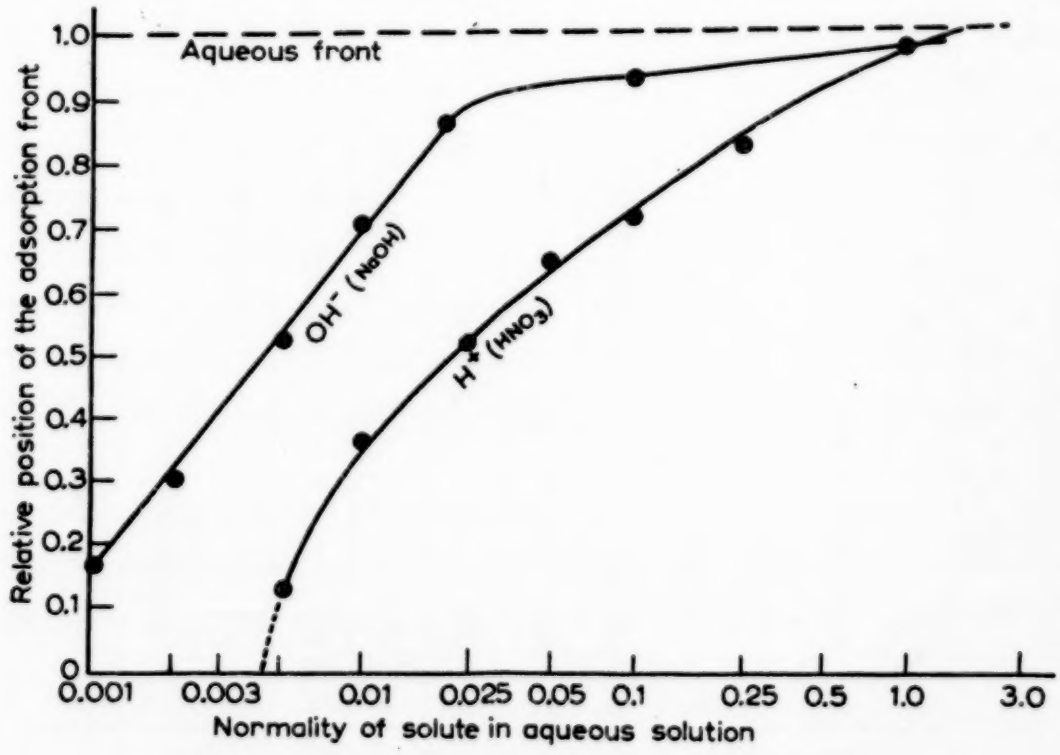


Fig. 3. The adsorption of acid or alkali by filter paper during chromatographic development with aqueous solvents.

had ascended the paper to a chosen height, the position of the acid or alkali front was located by moistening the paper with Universal Indicator. The results are recorded in Fig. 3.

With acid solvents there was a distinct break between the red acid zone (pH < 3) and the slightly acidic (pH 6) reaction of the remaining sections of the paper strip. With dilute alkaline solvents there was a transition of alkalinities from the purple band (pH 10) recorded in Fig. 3 to the slight acidity of the solvent front.

References p. 278.

DISCUSSION

This study confirmed that paper has a retarding effect on the movement of cations and is in agreement with the work of MILIĆEVIĆ[7] who separated groups of cations and anions with aqueous solvents. The results recorded in this paper can be interpreted by assuming an operating procedure similar to displacement analysis in chromatographic columns.

The developing solvents were all of equal ionic strength yet the presence of decinormal nitric acid in the solvent caused greater movement and less tailing than an equivalent amount of potassium nitrate (*cf.* symbols marked "1" and "7", Figs. 1 and 2).

One explanation for the effect of the acid in the solvent would be that the acid inhibits hydrolysis of the salts. Alternately, this effect can be attributed to hydrogen ions being more strongly adsorbed by the paper than most other cations. The acid would thus displace the cations and cause them to move as compact zones. Using a nitric acid solvent of pH 1, the R_F values of many of the cations were similar to the R_F value of the acid front for the same solvent. The tailing of bismuth and mercury salts using this solvent may indicate an adsorptive strength similar to the hydrogen ion. The reduced movement on substituting potassium ions in the solvent could illustrate its weaker adsorptive capacity.

With spotted solutes of molar concentration, the system is analogous to overloading an adsorption column with solutes. The paper in the path of the solute becomes saturated with cation and permits the bulk of the salt to move with the solvent. This leads to concentrated leading zones and extensive tailing. However, the presence of sufficient protons in the solvent will still cause displacement of the cation as a regular zone.

The observed movement of cations using solvents of pH 13 can be attributed to the adsorption of hydroxyl ions by the paper. During development of the chromatogram, the solvent at the liquid front would be virtually freed of hydroxyl ions before reaching the spot of metal salt. This salt would then move up the paper with the liquid front unless retarded by adsorption. Precipitation of the retarded ions would occur as they were overtaken by the following alkali front. When the paper is overloaded with solutes (*i.e.* molar solutions) considerable movement may occur before the leading edge is overtaken by the alkali. This would yield the marked tailing from the original spot detected with most salts.

Using solvents containing concentrations of acid and base corresponding to pH's of 4 and 10, there was no movement of the acid or alkali front above the point of immersion. The liquid flowing over the spotted solute will therefore be virtually neutral and the movement of the cations should be similar in both cases to results obtained with the solvent of pH 7. This similarity of behaviour is shown by the results recorded in Figs. 1 and 2. It has been shown[8] that cellulose adsorbs less acid from a solution containing acid and salt than from a solution containing acid only of the same pH. Thus the KNO_3 present in the solvent of pH 4 may be responsible for the slightly greater movement of some deci-molar solutes at this pH.

References p. 278.

Extrapolation of the hydrogen ion adsorption curve (Fig. 3) indicates that acid adsorption ceases in solutions of pH greater than 2.5. This corresponds approximately to the iso-electric point of cellulose and is in accordance with an observation of GAVORET[9] that purified cotton had a threshold of adsorption for Pb, Th and Cu salts at a pH of 2.7.

An inspection of the relative movements of the cations under the different conditions indicates that the approximate order of adsorption of the metal nitrates by Whatman No. 1 filter paper is Ni, Co, Cd $<$ Cu $<$ Ag, U, Hg, Pb $<$ Al $<$ Bi $<$ Fe.

CONCLUSIONS

In the absence of a lipoid solvent, the movement of cations on paper chromatograms appears to be controlled by a process of adsorption and displacement. The adsorption could be due to a form of ion exchange but this study was not suitable for confirming such a theory.

SUMMARY

Inorganic chromatograms were developed using aqueous solvents of different pH. The results obtained have been interpreted in terms of a process of adsorption and displacement.

REFERENCES

1 F. H. POLLARD AND J. F. W. MCOMIE, *Chromatographic Methods of Inorganic Analysis*, Butterworths Scientific Publications, London, 1953.
2 C. S. HANES AND F. A. ISHERWOOD, *Nature*, 164 (1949) 1107.
3 D. P. BURMA, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 549.
4 T. SCHÖNFELD AND E. BRODA, *Mikrochemie ver. Mikrochim. Acta*, 36/37 (1951) 537.
5 J. B. SCHUTE, *Nature*, 171 (1953) 839.
6 M. LEDERER, *Mikrochim. Acta*, 43 (1956) 195.
7 B. MILIĆEVIČ, *Bull. soc. chim. Belgrade*, 16 (1951) 101.
8 A. M. SOOKNE AND M. HARRIS, *J. Research Natl. Bur. Standards*, 25 (1940) 47.
9 J. G. GAVORET, *Ann. chim.*, [11] 15 (1941) 97.

Received November 22nd, 1957

THE STUDY OF RHODIUM(III) COMPLEXES BY PAPER ELECTROPHORESIS AND ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

PART II

M. LEDERER
Institut du Radium, Paris (France)

INTRODUCTION

Part I of this paper[1] dealt with the ageing of rhodium chloride solutions and the effect of HCl on freshly precipitated rhodium (III) hydroxide. It was there shown that the yellow solution obtained by adding HCl to rhodium hydroxide according to MACNEVIN AND MCKAY[2] did not yield a stable product, but a polycation or hydroxycation which, within hours, breaks down into cationic, neutral and anionic rhodium chlorocomplexes.

The methods used in this investigation were paper electrophoresis and ion exchange paper chromatography. Paper partition chromatography provided only information as to the feasibility of a separation with a given solution. It was concluded in this study that only paper partition chromatography may yield reliable separations of Rh–Pd or Rh–Pt, while ion exchange and paper electrophoresis were both unreliable.

In this paper we have examined the action of several mineral acids on rhodium hydroxide to determine whether other acids yield better defined ionic species more suitable for analytical separations.

EXPERIMENTAL

(1) *Preparation of rhodium hydroxide*

As starting product a 10% solution of rhodium chloride in *N* HCl was used, which itself had been prepared by dissolving rhodium hydroxide in HCl and which thus contained an equilibrium mixture of cationic, neutral and anionic species. 0.1 ml of this solution was mixed with 0.2 ml 2 *N* NaOH in a centrifuge tube, slightly warmed to induce precipitation, centrifuged and washed twice with distilled water by centrifugation.

(2) *Reaction of rhodium hydroxide with HBr*

To the rhodium hydroxide (*i.e.* about 5 mg) 0.2 ml of 0.42 *N* HBr was added and the solution warmed for a minute on the water bath to obtain a clear solution. This solution, originally yellow, turns reddish very quickly.

Paper electrophoresis immediately after bringing into solution, produced the

References p. 284.

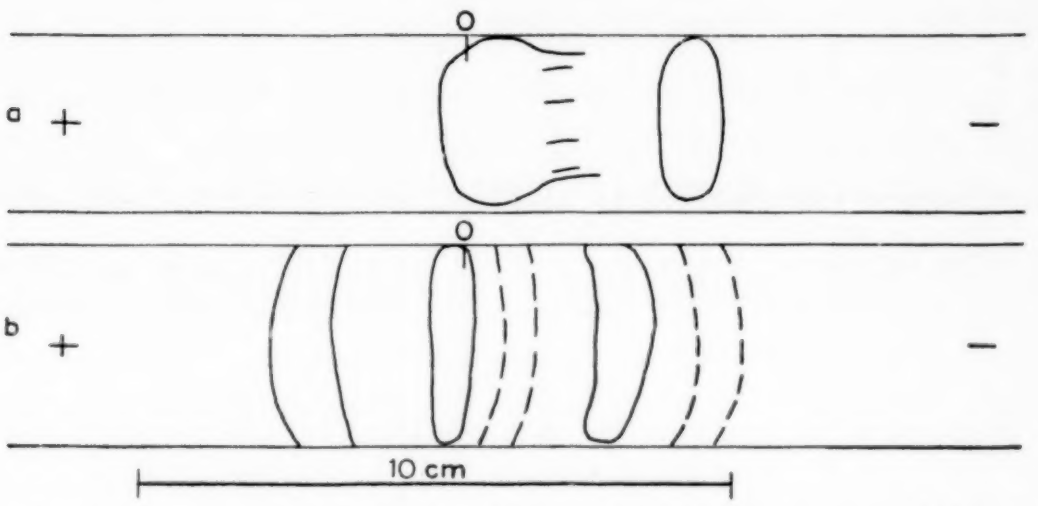


Fig. 1. a. Paper electropherogram of a fresh solution of $Rh(OH)_3$ in 0.42 *N* HBr (1 h with 200 V, electrolyte 5% HBr). b. Paper electropherogram of a one-week old solution of $Rh(OH)_3$ in 0.42 *N* HBr. Conditions as in Fig. 1a.

pattern shown in Fig. 1a, that is a slow moving cationic band analogous to that formed in HCl, which is preceded by a faint cationic band. Fig. 1b shows the same solution under the same conditions but seven days later. Five differently charged fractions can be identified.

Paper chromatography of the aged solution in butanol–3 *N* HCl and in butanol–10% HBr produces numerous spots, in the latter solvent also a trail stretching to the liquid front.

The HBr solution of rhodium hydroxide is thus still less suitable for analytical separations than a HCl solution.

(3) *Reaction of rhodium hydroxide with* HNO_3

To another portion of freshly prepared rhodium hydroxide, 0.2 ml of *N* HNO_3 were added. On gently heating, this yields a yellow solution which stays yellow for several weeks. Paper electrophoresis of the fresh solution in 0.1 *N* HNO_3–0.9 *N* $NaNO_3$ as electrolyte yields a slow moving cationic band and a faint faster cationic band as shown in Fig. 2a. After seven days the solution contains only two rather fast moving

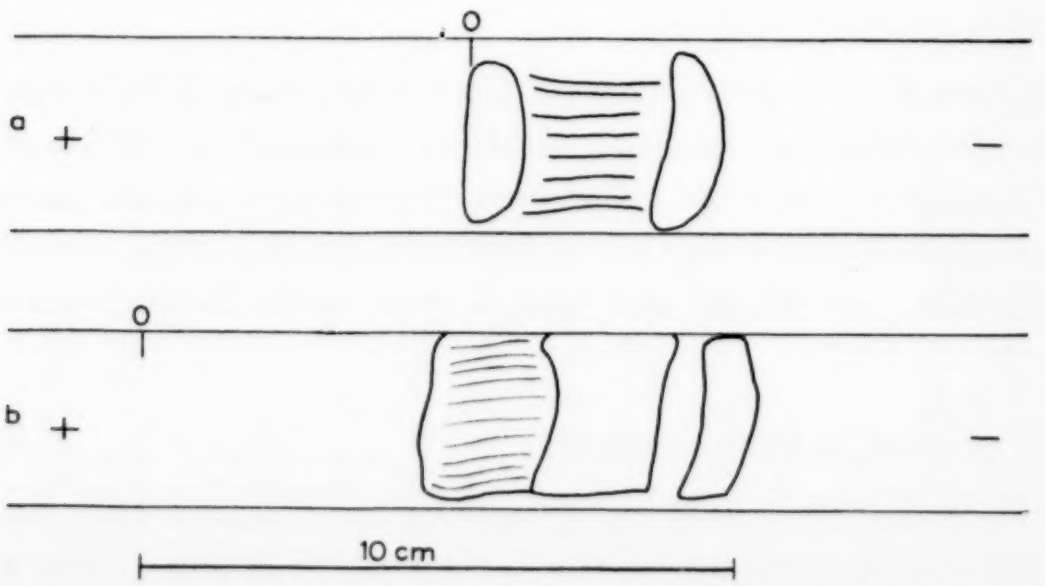


Fig. 2. a. Paper electropherogram of a fresh solution of $Rh(OH)_3$ in *N* HNO_3. (1 h with 200 V, electrolyte 0.9 *N* $NaNO_3$–0.1 *N* HNO_3). b. Paper electropherogram of a one-week old solution of $Rh(OH)_3$ in *N* HNO_3 (2 h with 200 V, electrolyte as in Fig. 2a).

References p. 284.

cationic bands as shown in Fig. 2b. The faster of these is only present in small quantities and reacts very slowly with $SnCl_2$–KI in 5 *N* HCl.

Normal nitric acid thus does not produce anionic rhodium complexes. To study further the nature of the cationic species, the aged solution was chromatographed on Dowex-50 paper with various concentrations of HNO_3, as shown in Fig. 3. The major

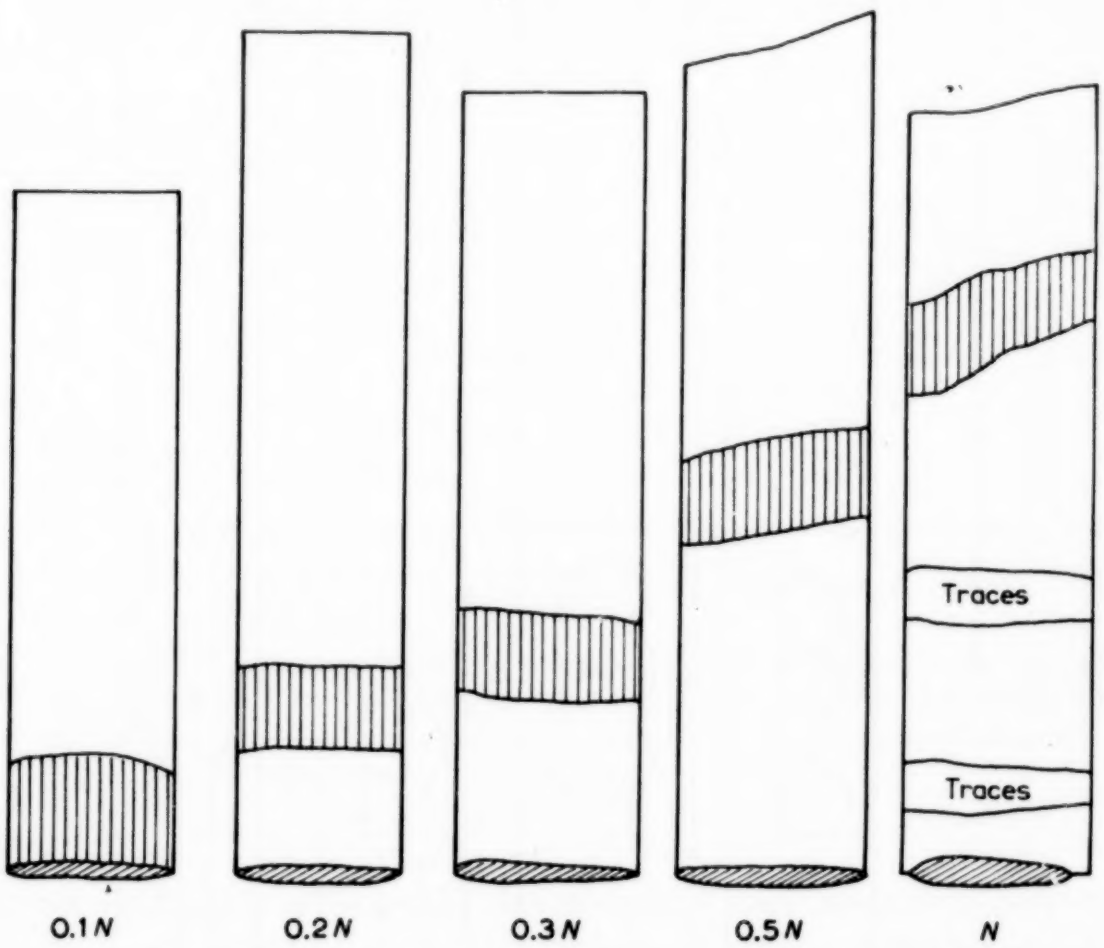


Fig. 3. Movement of Rh(III) nitrate complexes on Dowex-50 paper when developed with 0.1 *N*, 0.2 *N*, 0.3 *N*, 0.5 *N* and *N* HNO_3 (left to right). The R_F values of the major band (0.09, 0.19, 0.266, 0.46 and 0.75 resp.) correspond to the movement of a divalent cation. Another band stays at the point of origin.

fraction clearly behaves as a divalent cation (see Part I of this paper) while the small fraction which in electrophoresis moves ahead of the divalent cation is strongly adsorbed on the point of origin and not desorbed in acid concentrations sufficiently high to desorb trivalent cations. We suggest that this may be $Rh(H_2O)_6^{+++}$ which on adsorbing on Dowex-50 yields irreversible complexes with the sulphonic groups of the resin. Similar reactions have already been observed with chromium solutions. Partition chromatography in butanol–3 *N* HCl yields three spots as shown in Fig. 4. in butanol–HNO_3 10% two spots and a long comet.

(4) *Reaction of rhodium hydroxide with* H_2SO_4

A portion of rhodium hydroxide was mixed with 0.2 ml of *N* H_2SO_4 and warmed to produce a solution. This solution was yellow and did not visibly change colour on standing. Paper electrophoresis of the fresh solution with 5% Na_2SO_4–0.1 *N* H_2SO_4 as electrolyte yielded a weak cationic band and a single anionic band which is the major constituent. The pattern remains constant over 11 days; no changes being

References p. 284.

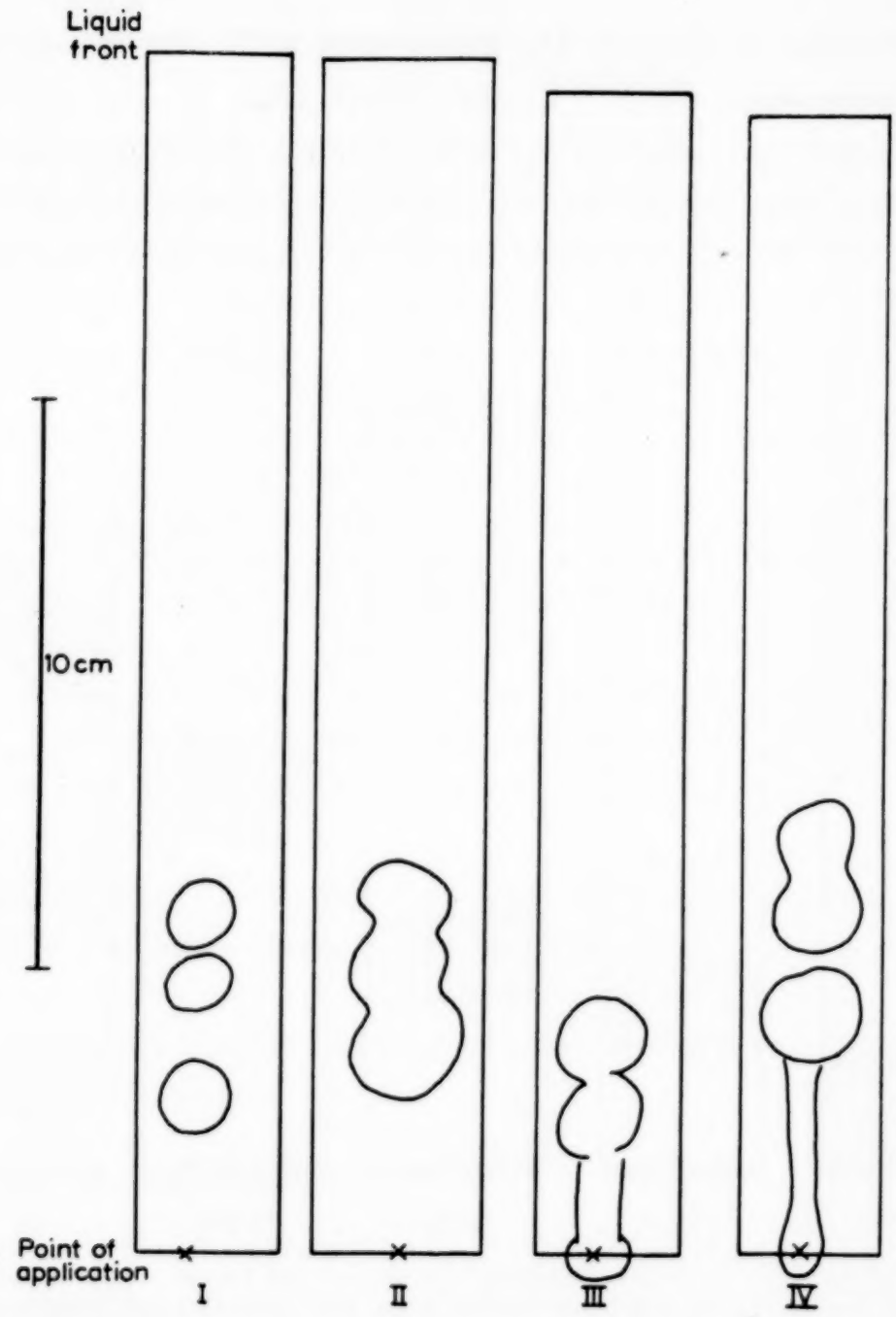


Fig. 4. Position of rhodium (III) after paper chromatographic development with butanol–3 *N* HCl: I. when the week-old solution in *N* HNO_3 is placed on the paper; II. when an aged solution of the chloride is placed on the paper; III. when a week-old solution in *N* H_2SO_4 is placed on the paper; IV. when a week-old solution in 0.42 *N* HBr is placed on the paper.

noted by paper electrophoresis. In butanol–3 *N* HCl three spots are produced as shown in Fig. 4.

To establish whether the anionic band contained sulphato-groups, we reacted another portion of the hydroxide with *N* H_2SO_4 containing radioactive ^{35}S (*ca.* 0.1 mc/ml). Fig. 5 shows the activity peaks in the solution containing ^{35}S which clearly shows that some sulphate is attached to the anionic band. To investigate the presence of SO_4^{--} groups in the cationic band, much higher activities would have to be used and this did not appear warranted in this case.

CONCLUSION

The reactions of rhodium (III) hydroxide with mineral acids can be represented by the scheme on the next page.

The unstable intermediate cation of low mobility is formed in HCl, HBr and

References p. 284.

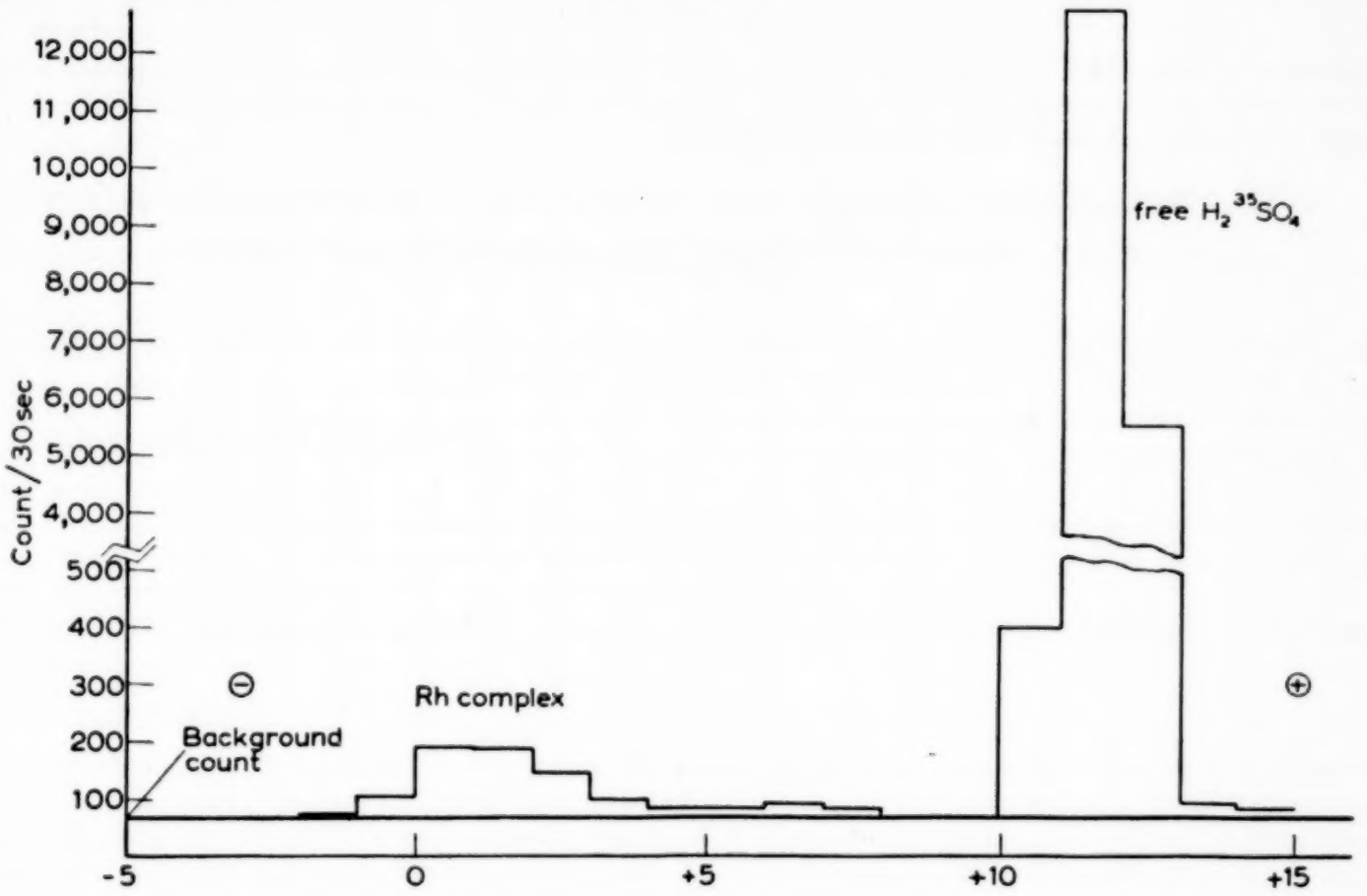


Fig. 5. Paper electropherogram of $Rh(OH)_3$ dissolved in N H_2SO_4 containing radioactive ^{35}S as tracer. The distribution of radioactivity along the paper is shown, indicating that some ^{35}S is attached to the anionic Rh band and does not move as free H_2SO_4. Conditions: 1 h with 200 V, electrolyte: 5% Na_2SO_4–0.1 N H_2SO_4.

HNO_3 but not in H_2SO_4. We would like to recall that Rh metal dissolves only in sulphuric and in none of the other acids. Both phenomena seem to be due to the better complexing ability of SO_4^{--} groups for rhodium.

In none of the acids examined, is there a single species which would promise to be suitable for ion exchange or electrophoretic separations. On the other hand all complexes appear to have a low solvent extractability and group themselves in the low R_F region when developed with butanol–3 N HCl. Paper chromatographic separation from elements such as Pt^{IV} or Pd^{II} is thus possible irrespective of the complexes which Rh(III) may form in mineral acids.

A sulphato anion and small amounts of a cation ← (+H_2SO_4) $Rh(OH)_3$ (+HCl or HBr) → Intermediate cation → Cationic complexes, Neutral complexes, Anionic complexes

$Rh(OH)_3$ (+HNO_3) → Intermediate cation → Divalent cation probably $[Rh(H_2O)_5NO_3]^{++}$; Traces of other cations most likely $[Rh(H_2O)_6]^{+++}$

References p. 284.

SUMMARY

The action of HBr, HNO_3 and H_2SO_4 on rhodium hydroxide has been studied with paper electrophoresis and ion exchange chromatography. Except in H_2SO_4, an intermediate unstable cation is formed which decomposes into several complexes.

REFERENCES

1 M. LEDERER, *Paper presented to the Congress on Analytical Chemistry*, Moscow, December 1957.
2 W. M. MACNEVIN AND E. S. MCKAY, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 1220.

Received November 27th, 1957

SHORT COMMUNICATIONS

On the suitability of Light Green as a stain for the quantitative evaluation of proteins in paper electrophoresis

The quantitative evaluation of proteins in paper electrophoresis is based on the equal dye-binding capacity of different protein fractions. Light green (LG), first proposed by CASPANI AND MAGISTRETTI[1], was claimed to satisfy such a criterion. Among the various protein stains used in paper electrophoresis that do not satisfy the above-mentioned fundamental criterion for suitable dyes LG seems to be a special one.

In this paper an attempt is made to ascertain whether LG is suitable for the quantitative estimation of proteins. This involves an investigation of linearity of dye uptake as a function of protein concentration as well as of the protein surface area on paper.

In addition, the general properties of the dye, and the best conditions of staining and elution are presented.

Materials and methods

Light green (LG) is a derivative of crystal violet in which a seventh methyl group has been introduced. It is a basic dye, mol. wt. 458. The LG used in our experiments was a Geigy (Switzerland) product. In order to develop the full colour, the spectrophotometric analysis of the dye was made at room temperature in 0.1 *N* NaOH, 20–25 min after addition of glacial acetic acid (3%, v/v); a Beckman spectrophotometer model DU was used.

Serum proteins. In our experiments pure human albumin and γ-globulin (kindly supplied by Istituto Sieroterapico Italiano) were used. Two 5% stock solutions were prepared in 0.15 *M* NaCl, from which dilutions of 0.5, 1.0, 2.0, 3.5% were made. The protein concentration was checked by the biuret method, according to GORNALL *et al.*[2].

Paper. The paper used throughout our experiments was Whatman No. 1 for chromatography.

Procedure. The measurement of dye uptake by proteins and the calculation of results were made according to the methods described in previous papers[3,4,5]. The complete procedure can be summarized as follows: preparation of proteins spots on filter paper strips by varying the amounts of each standard dilution; staining; rinsing; drying; measurement of surface area of each spot; elution and measurement of the dye eluted from each spot. Staining, rinsing, drying and elution are described in detail.

Results

Absorption spectrum. Fig. 1 shows the absorption spectrum of LG in 0.1 *N* NaOH after addition of glacial acetic acid (3%, v/v). The spectral analysis was made 30 min and 4 h after preparation of the dye solution. The absorption spectrum shows a maximum at 630–635 mμ and, at this wavelength, $E^{1\%}_{1cm}$ is 32.2.

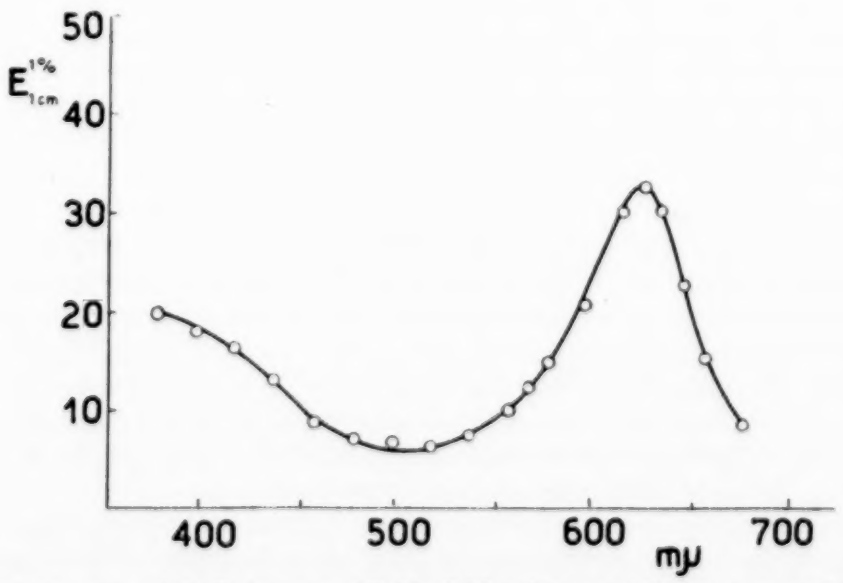


Fig. 1. Absorption spectrum of LG in 0.1 *N* NaOH after acidification with glacial acetic acid (for details see text).

Chromatography. Qualitative chromatographic analysis of the Geigy product used in our experiments, showed the presence of two green coloured components (R_F = 0.114 and 0.159). Chromatographic assay was made by the ascending technique using *n*-butanol–acetic acid–water (5:1:4, v/v).

Staining. The dye bath was an aqueous solution containing 0.5 g % LG and 10 g % trichloroacetic acid. The dye concentration was determined experimentally on the basis of a constant amount of dye bound by a standard quantity of protein in 40 min. The dye concentration suggested by previous authors[1] is in fact too low, and the staining procedure very time-consuming.

Rinsing. The rinsing liquid consisted of a 10% aqueous solution of trichloroacetic acid. Rinsing was repeated 3 times, for about 30 min, without agitation. The strips were then blotted gently on clean filter paper, and dried at room temperature.

Elution and colour development. The dye is eluted in 0.1 *N* NaOH for 30 min with occasional agitation. The elution liquid is colourless and becomes green on acidification. 3 ml of glacial acetic acid per 100 ml of eluate is the optimal amount that may be added to the elution liquid. The maximal intensity of the colour is reached 20–25 min after acidification. The dye concentration was estimated at 630 mμ, by comparison with a standard curve. The volume of the elution liquid was carefully chosen, in order to keep to the linear tract of the curve.

Dye uptake by proteins. Fig. 2 and Fig. 3 show the LG uptake by albumin and γ-globulin, respectively, in terms of μg LG/μg protein and μg LG/mm^2 spot as a function of protein concentration. Fig. 2 shows that a linear relationship exists for both proteins. It should be noted that

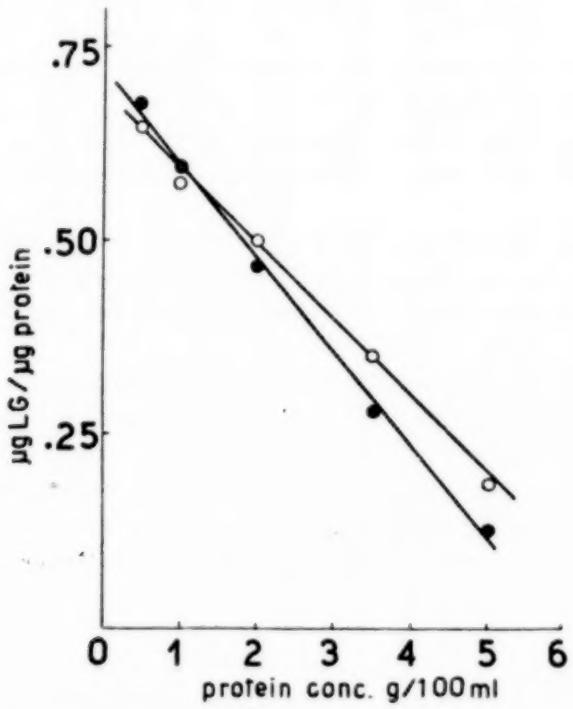


Fig. 2

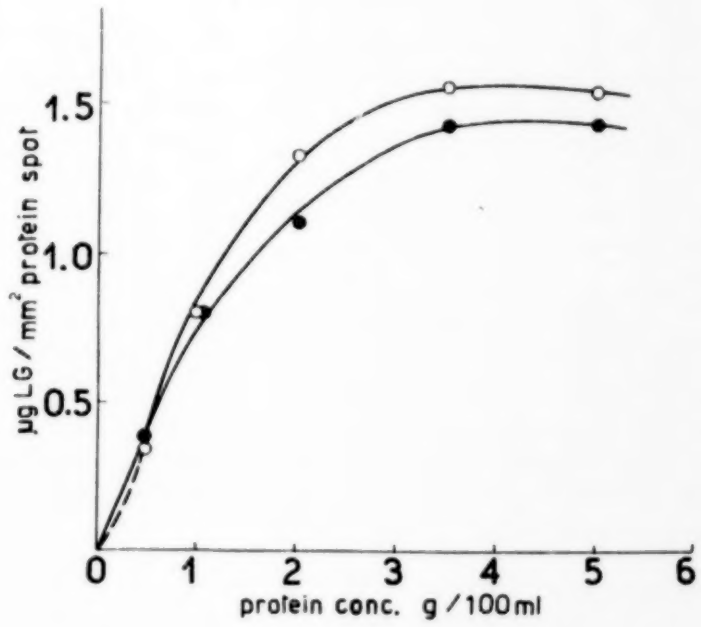


Fig. 3

Fig. 2. Uptake of LG by albumin (—○—○—) and by γ-globulin (—●—●—) per unit weight.
Fig. 3. Uptake of LG by albumin (—○—○—) and by γ-globulin (—●—●—) per unit area.

the behaviour of albumin and γ-globulin with regard to LG is very similar in the range 0.5–2.0 g protein %. Fig. 3 shows the course of the μg LG/mm^2 spot ratio with increasing protein concentration. According to the figure, the dye-binding capacity of γ-globulin seems to be smaller than that of albumin at higher concentrations, where a saturation value is attained at 2% for both proteins On the other hand, at a protein concentration of less than 1%, the behaviour is the reverse.

Discussion

Although the average LG uptake by proteins is relatively high as compared with that of bromophenol blue[3], and nearly similar to that of Azocarmine B[3,4] and Amidoschwarz 10 B[6], the extinction coefficient for LG is the lowest, so that the advantage offered by the first characteristic is cancelled out by the second.

The fundamental reason why LG is unsuitable for the quantitative estimation of proteins in paper electrophoresis, both by elution and, consequently, by scanning, is the non-proportionality between dye uptake and protein concentration, even when some other factors such as time and temperature of drying, time of staining etc., are kept constant.

Although the dye uptake is somewhat similar for both proteins over a rather wide range of concentrations, which was also observed in the case of bromophenol blue[3] and nigrosine[5], it is not possible to take advantage of this fact, because of the steepness of the curve in Fig. 2.

From this simple case, involving only two proteins, it can be inferred that in a more complex

system, such as blood serum, the quantitative results obtained by paper electrophoresis with LG will not be reliable.

The only advantage of LG is the absence of a coloured background.

*Institute of Human Physiology, University of Naples (Italy)** V. BONAVITA
V. SCARDI

[1] R. CASPANI AND M. MAGISTRETTI, *Plasma (Milan)*, 2 (1954) 1.
[2] A. G. GORNALL, C. J. BARDAWILL AND M. M. DAVID, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 751.
[3] V. SCARDI, A. ORENGO AND E. ROMANO, *Rass. med. sper.*, 2 (1955) 161.
[4] V. SCARDI, A. ORENGO AND E. ROMANO, *Boll. soc. ital. biol. sper.*, 31 (1955) 1327.
[5] V. SCARDI AND V. BONAVITA, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 287.
[6] V. SCARDI AND V. BONAVITA, unpublished data.

Received January 6th, 1958

* Postal address: Istituto di Fisiologia Umana, Università di Napoli, S. Andrea delle Dame 8, Napoli, Italia.

Nigrosine as a stain for quantitative estimation of serum proteins in paper electrophoresis

To the various dyes used for staining proteins in paper electrophoresis, another one has recently been added, namely nigrosine (NIG), which was proposed by ORTEGA in a short note[1].

The present paper deals with a study of the general properties of this dye, particularly its interaction with serum proteins on paper, and the results are compared with work carried out in recent years[2,3].

The main purpose was to check the dye-binding capacity of proteins at varying protein concentrations and surface areas on paper.

Materials and methods

Nigrosine. This dye is not a pure chemical compound, but a mixture of at least two dyes, induline violet and a yellow dye. The first is the sodium salt of a sulphonic acid derivative of the alcohol-soluble induline (indulines are phenylamine derivatives of safranines[4]). The NIG used in our experiments was a Merck product, which after qualitative chromatographic analysis appeared as a mixture of two deep blue components.

The absorption analysis of the dye in 0.01 *N* NaOH was made in a 1-cm cell, at room temperature, in the Beckman spectrophotometer model DU.

Serum proteins. Human albumin and γ-globulin fractions (by the courtesy of Istituto Sieroterapico Italiano) were used. The electrophoretic homogeneity was checked by free electrophoresis according to Tiselius. Two 5% stock solutions of the proteins were made in 0.15 *M* NaCl. The protein concentration was determined according to GORNALL *et al.*[5].

Paper. Whatman No. 1 was used in all experiments.

Estimation of dye uptake. Dilutions ranging from 0.5 to 5% were prepared from the albumin and γ-globulin stock solutions. By means of an Agla microsyringe each solution was applied, in duplicate, to paper strips 4 cm wide, as spots of 5, 10, 20, 30, 40 μl. The paper strips were divided by pencil into squares of 4 × 4 cm, and the protein solutions were applied in the center of each square. The protein spots were first dried in air, then at 105° in the oven for 15 min. Subsequently, they were placed for 10 min in a solution of NIG (1% in 1% acetic acid). The paper strips were washed in 1% acetic acid until the background paper was pale blue, after which they were allowed to dry at room temperature. The long and the short axis of the spots were accurately measured, and the surface area was calculated on the assumption that, when not perfectly circular, the spots were approximately elliptical. The paper strips were cut in square pieces (4 × 4 cm) and the dye eluted by soaking them in 10 ml of 0.01 *N* NaOH for 20–25 min.

Recovery experiments showed that the elution was almost complete. Whenever the extinction exceeded 0.800, the resulting blue solutions were diluted by adding known amounts of 0.01 *N* NaOH.

The amount of nigrosine eluted from each spot was determined spectrophotometrically at 560 mμ by comparison with a standard curve. This curve was prepared with solutions of NIG in 0.01 *N* NaOH with regularly increasing concentrations from 0 μg to 50 μg per ml; the slope of the curve was 0.0112.

Calculation of results. For each protein concentration two diagrams were made. In one the weight of the dye eluted was plotted against the protein weight and in the other against the area of each spot. The best fitting curves were drawn and the slopes measured; these represent, in the one case, the weight of dye bound to unit weight of protein, and in the other, the weight of dye distributed on the unit area of the protein spot.

Results

Absorption spectrum. Fig. 1 shows the absorption spectrum of NIG in 0.01 *N* NaOH. The spectral analysis was made within 15 min after the preparation of the dye solution and 24 h after. The absorption maximum is at 560–565 mμ and, at this wavelength, $E^{1\%}_{1\,cm}$ is 170. This latter value is very close to that of Azocarmine B. It is an overall and approximate value, comprising the various components of the mixture, and depending on the particular sample used in our experiments.

Dye uptake. Fig. 2 and Fig. 3 show the NIG uptake by albumin and γ-globulin, respectively, in terms of μg NIG/μg protein, and μg NIG/mm^2 spot as a function of protein concentration. The curves obtained from albumin and γ-globulin are neither linear nor completely superimposed.

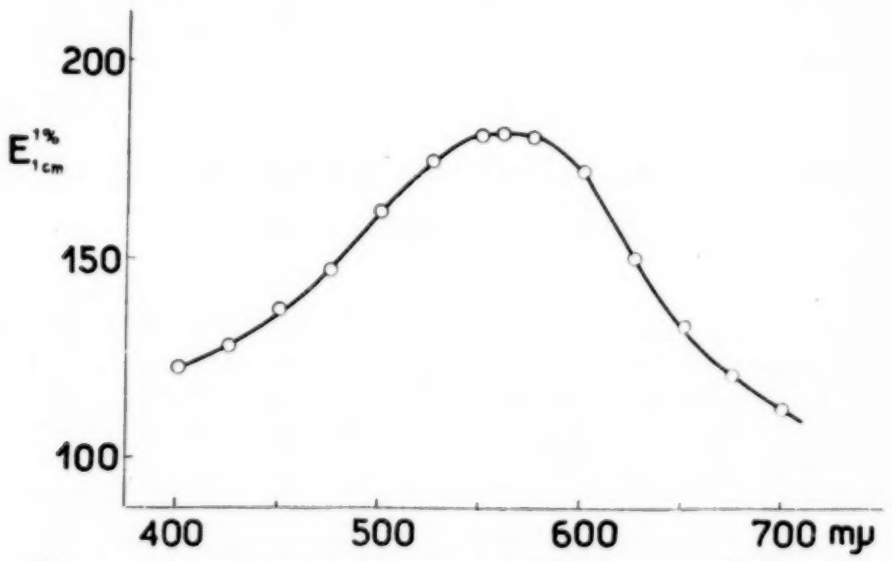


Fig. 1. Absorption spectrum of NIG in 0.01 *N* NaOH.

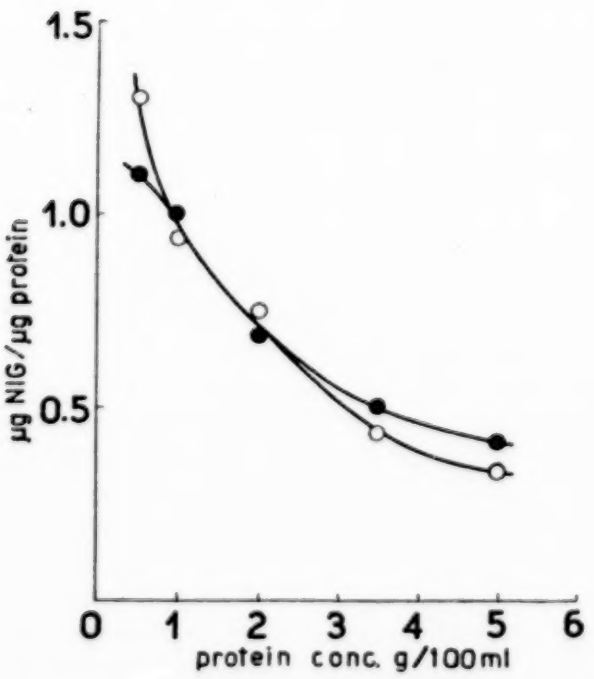


Fig. 2. Uptake of NIG by albumin (—○—○—) and by γ-globulin (—●—●—) per unit weight.

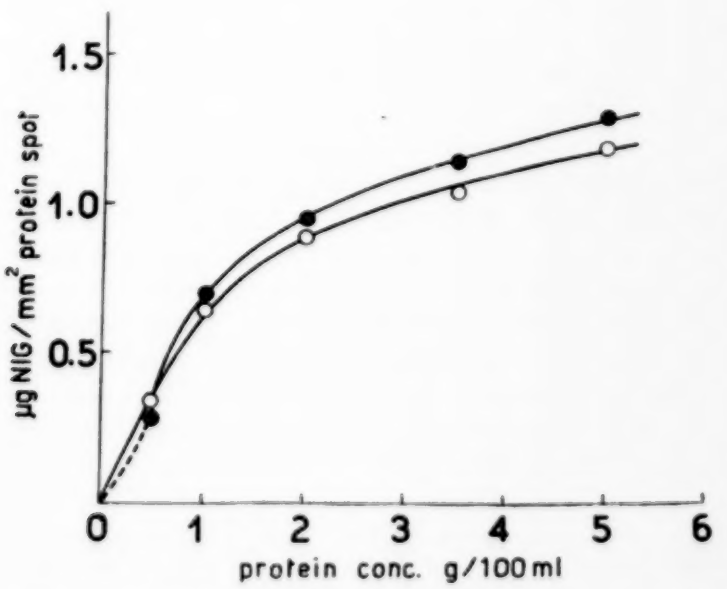


Fig. 3. Uptake of NIG by albumin (—○—○—) and by γ-globulin (—●—●—) per unit area.

The dye uptake by γ-globulin (Fig. 2) appears to be less than that of albumin at the lowest concentration; the reverse was found at higher concentrations. This is obvious also from Fig. 3.

Discussion

Our results show that the dye-binding capacity of protein for NIG is the highest so far observed among dyes used in paper electrophoresis[2,3].

The dye uptake, however, varies with protein concentration as well as from one protein to another, at least for the lowest and the highest concentrations. At the lowest concentrations, the different binding capacity of albumin and γ-globulin can most likely be ascribed to the chemical nature of the dye, whereas at the highest concentration, where the behaviour is reversed, another factor may be involved, namely the protein density on paper. This effect was previously observed in the case of bromophenol blue[2,3].

In addition to this behaviour of NIG with regard to different proteins, there are some other factors that must be considered. NIG does not satisfy the rest of the criteria of a dye suitable for routine work. Although it is cheap, easy to use and stable, it does not stain only protein, but paper as well. Furthermore, since it is a mixture of different dyes, its behaviour is subject to variation from one batch to another, a property it has in common with a great number of dyes currently used.

We are therefore of the opinion that NIG cannot be recommended as a stain for the quantitative determination of protein in paper electrophoresis.

*Institute of Human Physiology, University of Naples (Italy)** V. SCARDI
V. BONAVITA

[1] M. ORTEGA, *Nature*, 179 (1957) 1086.
[2] V. SCARDI, A. ORENGO AND E. ROMANO, *Rass. med. sper.*, 2 (1955) 161.
[3] V. SCARDI, A. ORENGO AND E. ROMANO, *Boll. soc. ital. biol. sper.*, 31 (1955) 1327.
[4] H. J. CONN, *Biological Stains*, Biotech. Publications, Geneva, N.Y., 1946.
[5] A. G. GORNALL, C. J. BARDAWILL AND M. M. DAVID, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 751.

Received January 6th, 1958

* Postal address: Istituto di Fisiologia Umana, Università di Napoli, S. Andrea delle Dame 8, Napoli, Italia.

Chromatographic evidence for the existence of a protactinate ion

So far no evidence for the existence of a protactinate seems to exist, except for the observation that the yield of Pa_2O_5 is decreased if this substance is washed with alkali.

We wish to present here some chromatographic and electrophoretic evidence that Pa(V) may be dissolved in alkali and that such a solution has similarities to a solution of tantalate. The isotope of Pa used in these experiments was a preparation of ^{233}Pa in 6 N HCl which was shown in numerous experiments to be free from fluoride and radioactivities other than ^{233}Pa. When the 6 N HCl solution is evaporated and stirred with 5 N NaOH, a suspension is obtained, which when placed on a paper strip and developed with N NaOH stays at the point of origin (Fig. 1). Another sample

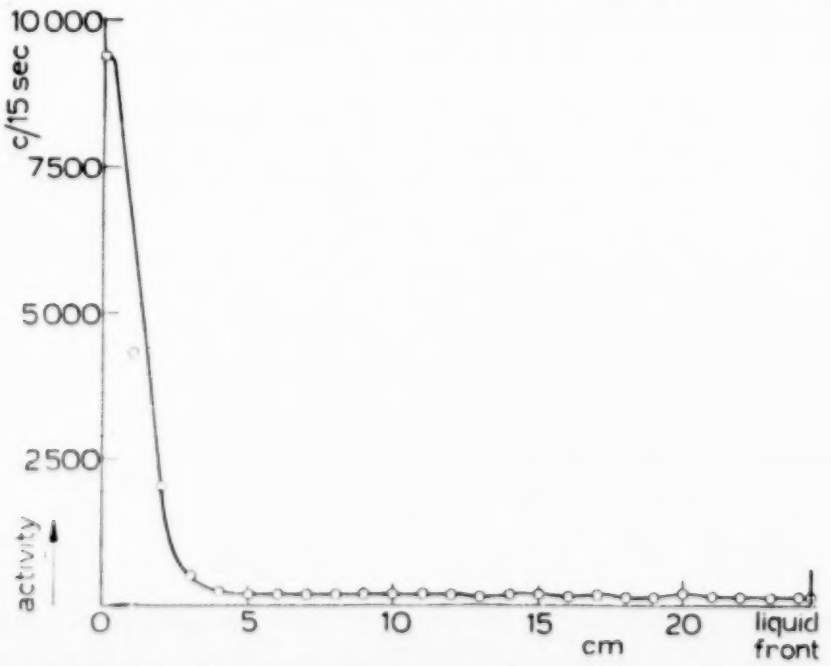


Fig. 1. Distribution of ^{233}Pa on the chromatogram when the tracer is mixed with 5 N NaOH solution. Whatman No. 1 paper. Developing solvent N NaOH.

was evaporated and fused with about 100 mg of NaOH in a micro-beaker for a few minutes and the melt dissolved in sufficient water to produce a 30% NaOH solution. When this solution is chromatographed with *N* NaOH on a paper strip, part of the activity migrates with the solvent and part stays at the point of application (Fig. 2).

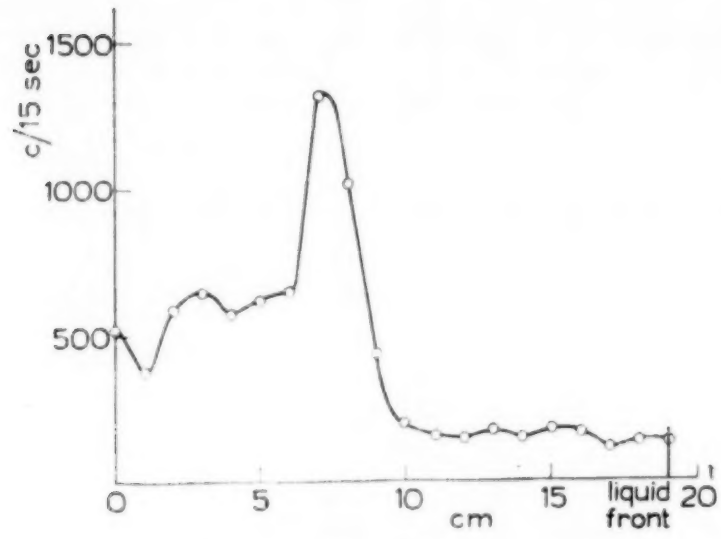


Fig. 2

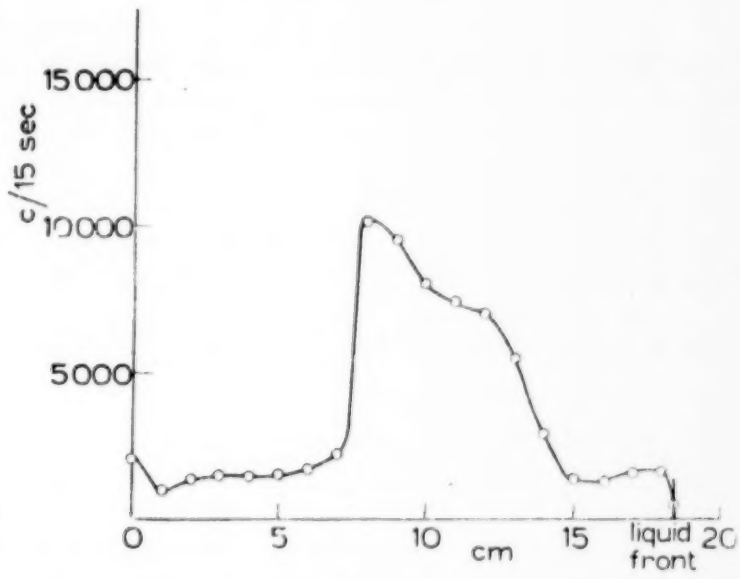


Fig. 3

Fig. 2. Chromatogram of a NaOH fusion of Pa tracer. Solvent: *N* NaOH.
Fig. 3. Chromatogram of a KOH fusion of Pa tracer. Solvent: *N* KOH.

According to SCHOELLER AND POWELL[1] Ta(V) dissolves in a NaOH melt but not in 30% NaOH, and is more soluble in a KOH melt than in NaOH. We thus evaporated another sample and fused it as above with 100 mg KOH. As shown in Fig. 3 the Pa(V) activity is almost completely in the region of R_F 0.5 with only traces at the start. Since barium tantalate is insoluble, we added some $Ba(OH)_2$ to the KOH melt, applied the suspension so formed to paper and developed with saturated baryta. As shown in Fig. 4 the ^{233}Pa activity stays at the start under these conditions. Paper electrophoresis of the melt diluted with sufficient water to bring the concentration of KOH to about *N* yielded a single slow moving anionic band as shown in Fig. 5. Paper chromatography indicates already that the soluble form of protactinium is more adsorbed than many anions, so the slow movement may be due to adsorption and/or a low charge on the anion. From past experience and comparison with the movement of CrO_4^{--} we take it as most likely that the anion has one negative charge.

We have thus observed a form of Pa(V) soluble in alkali under conditions which render Ta(V) soluble and with properties similar to tantalate. Its movement in paper chromatography

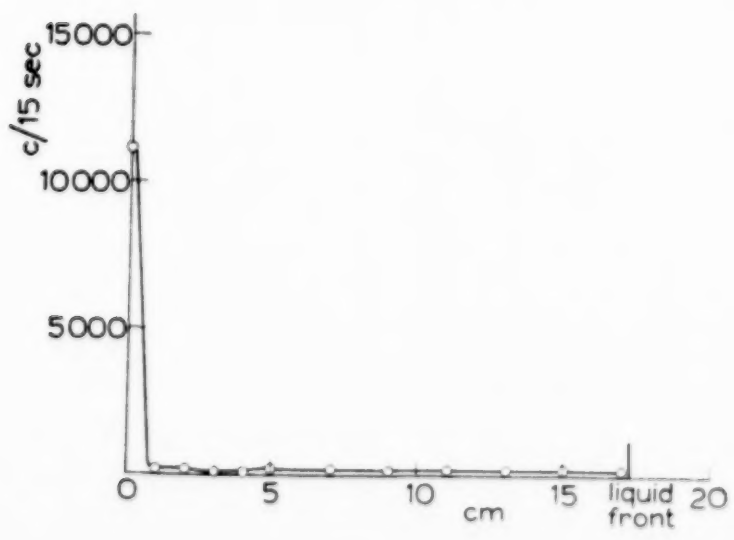


Fig. 4

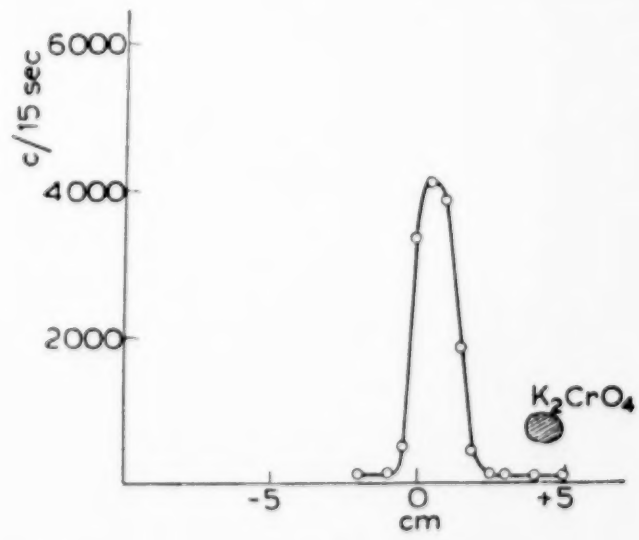


Fig. 5

Fig. 4. Chromatogram of a mixture of the KOH melt with $Ba(OH)_2$ solution. Solvent: saturated $Ba(OH)_2$.
Fig. 5. Electropherogram of the KOH melt of Pa tracer (diluted to *N* KOH). 300 V, 1 h 23 min with *N* KOH as electrolyte. A spot of CrO_4^{--} run on the same sheet is also shown.

with aqueous solvents seems to exclude the possibility of a colloidal suspension. Its electrophoretic movement suggests the anionic nature of the Pa(V) in solution. We hence propose that a protactinate ion has been prepared and that contrary to current belief Pa(V) has amphoteric properties. The failure of other workers to obtain a soluble protactinate may be due to the fact that most experiments were conducted with macro amounts of ^{231}Pa which perhaps is not very easily attacked.

Institut du Radium, Paris (France)

Z. JAKOVAC
M. LEDERER

[1] W. R. SCHOELLER AND A. R. POWELL, *The Analysis of Minerals and Ores of the Rarer Elements*, 3rd ed., Griffin, London, 1955.

Received March 7th, 1958

Detection of pyrimidine deoxyribosides and deoxyribotides on paper chromatograms

Because of the biological significance of pyrimidine deoxyribosides and deoxyribotides, their detection on paper chromatograms is important. This can be achieved by spraying with the cysteine–sulphuric acid reagent[1] or by microbiological methods[2]. In the former method the colour fades quickly, while the latter method is time-consuming. The diphenylamine spray[3], which is very useful for purine deoxyribosides and deoxyribotides, is not very suitable for the pyrimidine derivatives owing to the stability of the glycosidic bond. The sensitivity of the method is therefore much less in the case of pyrimidine derivatives than in that of purine derivatives. It is well known that bromination[4] of the pyrimidine ring in nucleosides and nucleotides renders the glycosidic bond acid-labile. We have found that the diphenylamine method can be used to detect the pyrimidine nucleosides and nucleotides after treatment of the chromatogram with bromine. The method is as follows: The dried chromatogram is put on a glass plate and dabbed carefully with a piece of cotton-wool soaked in a solution of bromine–water–acetic acid (1:50:10 v/v/v). To prevent the zones from becoming diffuse, the paper must not be too wet. The paper is placed between two glass plates at 100° for 5 minutes and is then treated with the diphenylamine–sulphuric acid reagent in the standard manner[3]. Thymidine, deoxycytidine, deoxyuridine, thymidylic acid and deoxycytidylic acid all give blue spots on paper when submitted to this procedure. The sensitivity of the method is recorded in Table I, and that of the diphenylamine–sulphuric acid spray without bromination, is given for comparison.

TABLE I

The amounts recorded are those that give a distinctly visible spot on a chromatogram

Substance	*Without bromination*		*With bromination*	
	μ moles	*μg (approx.)*	*μmoles*	*μg (approx.)*
Deoxycytidylic acid	1/4	72	1/16	18
Deoxycytidine	1/8	28	1/32	7
Thymidylic acid	1/4	80	1/16	20
Thymidine	1/4	60	1/16	15
Deoxyuridine	1/4	57	1/16	14

It can be seen from the table that bromination increases the sensitivity of the diphenylamine spray four times.

Department of Biochemistry, University of Oslo, Blindern (Norway)

JON JONSEN
L. HAAVALDSEN
S. LALAND

[1] J. G. BUCHANAN, *Nature*, 168 (1951) 1091.
[2] W. A. WINSTEN AND E. EIGEN, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 989.
[3] J. G. BUCHANAN, C. A. DEKKER AND A. G. LONG, *J. Chem. Soc.*, (1950) 3162.
[4] T. G. BRADY AND E. MCEVOY-BOWE, *Nature*, 168 (1951) 299.

Received March 24th, 1958

NEW BOOKS

Chromatografia Gazelor, by MARIANA ESAYAN AND LEON ESAYAN. (Editura Tehnica, București, 1957), 158 pp., 76 figures, 55 references. (In Roumanian.)

Chromatographic Techniques, Clinical and Biochemical Applications, by IVOR SMITH, with a foreword by C. E. DENT. (Heinemann, London, 1958), 309 pp., price 45 s net.
Except for an incomplete and inaccurate chapter on theory, a good account of clinical applications of paper chromatography.

Papierchromatographie, by FRIEDRICH CRAMER, 4th, greatly enlarged edition. (Verlag Chemie, Weinheim, 1958), 215 pp., 91 figures, 8 coloured plates and numerous tables, price D.M. 21.—. (In German.)

RECEIVED
AUG 13 1958
ESSO TECHNICAL LIBRARY

REVIEW

PAPER CHROMATOGRAPHY OF CHLOROPLAST PIGMENTS

ZDENĚK ŠESTÁK
Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science, Prague (Czechoslovakia)

The classical method of chromatography of chlorophylls and carotenoids on an adsorbent column is somewhat time-consuming and is more suitable for separating larger quantities of pigments. Therefore many authors have tried to develop a simpler method of separating these substances on paper. With the methods that have been described in the literature it is possible to analyse quantities of pigments of the order of 10^{-6} g. In recent years various modifications of these methods have been described and they have been used on a larger scale than before (more than 50 articles since 1952). Some of these articles have been reviewed in three communications[15,37,55]. In this paper we are attempting to give a more complete list of articles on paper chromatography of plastid pigments. Modifications of the methods that have been described in the literature are summarized in Tables I–V.

OLDER PUBLICATIONS

The first time a separation of plastid pigments on paper was mentioned, was in 1906. At that time the founder of chromatography, M. TSWETT[60], described a separation of pigments from an aqueous alcohol solution by capillary analysis. As a result he obtained five zones most of which were close together. At the bottom of the paper strip a zone containing a mixture of all the pigments was found, then came the following zones, in ascending order: carotenes, chlorophylls, xanthophylls. Capillary analysis, from a mixture of ethyl ether and 96% ethanol (1:1 to 1:2), was also used by KYLIN[34] for the detection of carotene, xanthophyll, phyllorhodin, fucoxanthin and chlorophyll in saponified extracts of higher plants and brown algae.

BROWN[10] experimented with the circular chromatographic method on blotting paper. The paper, 15 × 15 cm (untreated or impregnated with aluminium hydroxide), was sandwiched between two glass plates. The solution of pigments in carbon disulfide was placed on the paper through a 6 mm hole at the centre of the upper plate. The chromatogram was developed by adding the pure solvent drop by drop.

STRAIN (ref. 58, p. 77) briefly mentioned the separation of pigments on paper by developing with aqueous ethanol. The possibility of separating pigments on wide sheets of paper or on cylinders of paper was proposed by ARONOFF (ref. 3, p. 55; see [36]), the chromatograms being developed repeatedly with petroleum ether.

EVOLUTION OF THE METHOD SINCE 1952

Although MÁRKUS and ASAMI reported their experiments with paper chromatography of plastid pigments at two scientific meetings as early as 1951, and although ASAMI

References p. 307/308.

published a short article in Japanese in the same year[4], the method did not begin to develop favourably until 1952. At that time five independent groups of scientists published their papers dealing with this method. These communications came from BAUER[8] in Germany, MÁRKUS[38] in Hungary, ASAMI[5] in Japan, and from two French teams specially working on the separations of carotenoids, GRANGAUD AND GARCIA[23,24] and SPITERI AND NUNEZ[56]. The methods of these authors have been modified by many further workers. One- and two-dimensional techniques in ascending, descending and circular arrangements have been described. Different commercial brands and different types of paper have been used, sometimes after a preliminary treatment, such as drying, washing or impregnation. The chromatograms have been developed with polar and nonpolar organic solvents or their mixtures. In some experiments the atmosphere in the chromatograph chamber was specially prepared, *e.g.* by saturation with water vapour or vapours of petroleum ether; in some cases the chamber was filled with an inert gas (*e.g.* nitrogen). Chromatograms have been developed at laboratory temperature or at a somewhat lower temperature. A survey of the methods that have been described in the literature is presented in Tables I to V. The developing solvents and mixtures examined, the types of paper used, the techniques of placing the extract on paper, the conditions of development (atmosphere, temperature, time of development) and plant material used are summed up in these tables. Satisfactory developing solvents are printed in bold face; the relative quantity of each solvent in the mixtures is given in parts by volume.

Communications describing the use of the method of BAUER[8], with or without slight modifications, are summarized in Table I. Good results have been obtained especially on developing with the mixture petrol–petroleum ether–acetone (10:2.5:2), in which petrol is sometimes replaced by benzene. The methods of Japanese authors (Table II), who used the Japanese paper Toyo No. 50 and developing mixtures containing toluene, occupy a somewhat exceptional position, since the quality of paper can influence the partition in a rather significant manner. Methods in which other developers than those derived from BAUER'S[8] mixture and other papers than Toyo paper were used, are summed up in Table III. The remarkable article by MÁRKUS[38], in which the influence of various developers and various types of paper on the separation of pigments has been carefully examined, has rarely been cited. A specially arranged evacuated chamber and development with a five-component solvent mixture have been described by HAGER[27,28].

In Tables I–III a survey of methods based on the main principles of adsorption is presented. In Table IV a summary is given of methods, which, according to their originators, are based on the principles of partition chromatography[15,16,48]. DOUIN[15,16] developed his chromatograms on paper moistened with water. He placed a perforated glass cylinder in the development chamber to ensure contact of the solvent (100% methanol) with water vapour. SERCHI, MICHI AND RAPI[48] used the circular development technique. Methods based on the principle of the so-called "reversed-phase chromatography" may also be found in Table IV. In this technique paper is impregnated with a nonpolar substance (triglycerides, vaseline, etc.), a strongly polar solvent

References p. 307/308.

being used as developer. The sequence of spots is approximately the reverse of that obtained with the usual type of paper chromatography, where at least small amounts of water (polar component) are held on the paper. The "reversed-phase" technique has been used by SPITERI AND NUNEZ[56] and STRAIN[59], and NUNEZ[40] (see Table V) has resolved carotenoids by this method. STRAIN[59] has tested different techniques of preliminary preparation of cellulose paper and glass paper, as well as different types of separation (a–d in Table IV).

Data of the separation of only carotenoids from extracts have been collected in Table V.

RESULTS OF THE CHROMATOGRAPHIC SEPARATION

Except in the case of "reversed phase" chromatography, the pigments are resolved with different solvents on one-dimensional chromatograms in the following general order (beginning from the starting point): chlorophyll b–chlorophyll a–pheophytins–carotenes. The greatest difficulties are caused by xanthophylls, which sometimes form one spot, while in other developing solvents several spots may arise (lutein–violaxanthin–neoxanthin and others). These spots lie in front of, between, or behind the spots of chlorophylls, often overlapping them, and thus interfering with the isolation of microquantities of pigments. The "R_F" values* of carotenoids depend on the number of oxygen atoms in their molecules: carotenoids containing fewer atoms of oxygen (less polar compounds) possess a greater "R_F" value[54]. Carotenes (without oxygen) run immediately behind the solvent front, followed by xanthophylls with two oxygen atoms in their molecules (*e.g.* lutein, zeaxanthin); the spot(s) of xanthophyll-epoxide(s) with four oxygen atoms (violaxanthin, neoxanthin, etc.) has (have) the smallest "R_F". Up to the present no successful developer has been found for resolving the carotene spot into α- and β-carotene. The pheophytins form one or two spots (pheophytin b and pheophytin a). Some authors[27, 28, 53, 54] have succeeded in separating pheophorbides as one or two spots. Chlorophyllides and similar hydrophilic compounds do not run with the solvent but remain at the starting point[5, 8, 27, 28, 49, 53, 54]. FOUASSIN[19, 20] separated Zn- and Cu-derivatives of chlorophyll and found that chlorophylls in which Mg was replaced by Zn moved quite similarly to normal chlorophylls a and b, whereas chlorophylls with Cu instead of Mg had "R_F" values similar to pheophytins. Double spots of chlorophylls have been observed on some chromatograms[5, 49, 57]. They have usually been regarded as isomers—chlorophylls a′ and b′, originating during the preparation of the extract or during the process of paper chromatographic separation. A colourless spot fluorescing in U.V. light has also been observed[36, 49].

For better resolution of some pigments, two-dimensional chromatography has sometimes been used[8, 36, 39, 45]. However, this technique is slower than one-dimensional chromatography, and is therefore not favourable for the unstable plant pigments.

Using "reversed-phase" chromatography the sequence of pigment spots is

* "R_F" in this paper indicates only the approximate position of the spots on the paper, no definite value as is the case in the chromatography of amino acids and other compounds. Therefore quotation marks are used.

References p. 307/308.

TABL

MODIFICATIONS OF T

1 Author	2 No. of dimensions	3 Ascend. (A) or descend. (D)	4 Paper, sort and dimension	5 Preliminary treatment of the paper
BAUER[8], 1952	1	(A or D)	Schl. & Schüll 2043 b (strips 10–15 cm long)	dried at 105°
	2		Schl. & Schüll 2043 b (10 × 10 cm)	
SIRONVAL[52,53,54], 1953, 1954, 1957	1	D	Whatman No. 1 (45 × 5 cm)	
BLAAUW-JANSEN[9], 1954	1	A	Whatman No. 4	buffered at pH 6
ANDERSEN AND GUNDERSEN[1], 1955 GUNDERSEN AND FRIES[26], 1956	1	D	Whatman No. 1 (strip 50–70 cm long)	
RÖBBELEN[43], 1956	1	A	Schl. & Schüll 2230	
GAGE AND ARONOFF[22], 1956	1	D	Schl. & Schüll 539	
MÜLLER[39], 1957	2	A	Schl. & Schüll 2043 bM (18 × 18 cm)	

References p. 307/308.

I*

METHOD OF BAUER[8] (1952)

6 *Placing the sample on paper; solvent used*	7 *Developing solvent or solvent mixture***	8 *Conditions of development****	9 *Plants analysed*
	monochlorobenzene **toluene** **petrol–PE–Ac (10:2.5:2)** **petrol–PE–Ac–Me (10:2.5:1:0.25)** Ac petrol PE Me		*Tradescantia albiflora*
	1st dim.: **petrol–PE–Ac (10:2.5:2)** 2nd dim.: **petrol–PE–Ac–Me (10:2.5:1:0.25)** (in mixtures PE can be replaced by monochlorobenzene or by toluene)		
a piece of plant tissue is squeezed on the starting point acetone extract	**benzene–PE–Ac (10:2.5:2)**	S.F.–S.P.: 40 cm atmosphere of PE + 23°	*Heracleum* *Pelargonia* *Fragaria*
ethyl ether extract	**benzene–PE–Ac (10:2.5:2)**		*Chlorella vulgaris*
ethyl ether or acetone extract	**benzene–PE–Ac (10:2.5:2)**	15° atmosphere of PE	pigments in gyttja pith and xylem of: *Corylus avellana* *Fagus silvatica* *Salix caprea*
acetone	**benzene–PE–Ac (10:2.5:2)**		*Arabidopsis thaliana*
	benzene–PE–Ac (10:2.5:2)	atmosphere of PE	*Soja hispida*
acetone	1st dim.: **petrol–PE–Ac (10: 2.5:2)** 2nd dim.: **petrol–PE–Ac–Me (10:2.5:1:0.25)**		*Abies alba*

* Abbreviations used in Tables I to V: PE = petroleum ether; Me = methanol; Ac = acetone.

** Satisfactory mixtures are printed in bold face; other mixtures that have been tested are also given.

*** Duration of the development; distance of solvent front from the starting point (S.F.–S.P.); temperature; atmosphere in the chamber.

References p. 307/308.

TABLE

METHODS OF

1	2	3	4	5
ASAMI[5,7], 1952, 1955	1	A	Toyo filter paper 50 (1.2 × 35 cm)	
CHIBA AND NOGUCHI[14], 1954 CHIBA[13], 1955	1	A	Toyo filter paper 50	
KATAYAMA AND SHIDA[32,33], 1956	1	A	Toyo filter paper 50	

TABLE

OTHER

1	2	3	4	5
MÁRKUS[38], 1952	1	A or D	**Schl. & Schüll 602 e.h.** (the following papers were also tested: Hungarian paper, no brand mentioned Schl. & Sch.: 595, 597, 598 Swedish paper, no brand mentioned Munktell OB Macherey-Nagel 640 D) (paper strips 20–25 cm long)	paper equilibrated with atmosphere of acetone
LIND, LANE AND GLEASON[36], 1953	2	A	Whatman No. 1 (23 × 23 cm)	washed with PE and dried
HARDER AND KOCH[30], 1954	1	A	Schl. & Schüll 2043 b (strip 3 cm wide)	dried at 60°

References p. 307/308.

II*

JAPANESE AUTHORS

6	7	8	9
Me–Ac (3:1)	**toluene** **carbon tetrachloride** **xylene** } **anhydrous or saturated with water** *n*-butanol isobutanol benzene chloroform } anhydrous or saturated with water Me 100% or 80% ethanol 100% or 80% phenol 80% cyclohexanol Ac lutidine collidine petrol (b.p. 45–60°) ethanol–*n*-butanol (1:1) Me–ethanol (1:1) benzene–petrol (1:1)		*Trifolium repens*
ethyl ether	**toluene** **toluene–90% ethanol (200:1)**	time: 15 to 30 min	*Trifolium repens*
Me–Ac (3:1)	**toluene–PE (2:1)**	time: 40 min + 1 to + 2°	*Oryza sativa*

III*

METHODS

6	7	8	9
acetone	**petrol–Ac–Me (30:1:0.03)** **PE–Ac (20:1)** PE (b.p. 35–40°) PE–Me (20:1) Pe–Ac–toluene (20:1:1) PE–Me–benzene (60:3:1) petrol (b.p. 60–70°) petrol–Ac (20:1) petrol–chloroform (20:1) petrol–ethyl ether (20:1) petrol–Ac–benzene (40:2:1) petrol–Me–benzene (40:1:1) petrol–Ac–*n*-butanol (20:1:0.3)	time: 2–3 h S.F.–S.P.: 20–25 cm 20° atmosphere of PE	*Solanum lycopersicum* *Spinacia oleracea*
PE	1st dim.: first **acetone** then **PE** finally **PE–propanol (99:1)** 2nd dim.: **PE–chloroform (3:1)**	S.F.–S.P.: 1 cm 20 cm 20 cm 16 cm time: 1 + 1 h	*Soja hispida*
PE (xanthophylls have previously been eluted with methanol)	First **toluene** then **PE–isobutanol (100:15)**	S.F.–S.P.: 8 cm time: 15 + 3 min	*Pediastrum tuberculata* (Chloroph[illegible])

* For abbreviations and column headings see Table I.

(Contd on p. [illegible])

References p. 307/308.

TABLE III

1	2	3	4	5
Bukatsch[18], 1954	1			
Polasek[48,49], 1954	1	D	Whatman No. 1 (40 cm long)	
Sporer, Freed and Sancier[52], 1954 Freed, Sancier and Sporer[21], 1954	1	A	Whatman No. 1 (strip 3 cm wide)	impregnated with a solution of sucrose (0.18 g/ml in distilled water) and dried at 100°
Sapozhnikov, Bronshtein and Krasovskaya[45], 1955	1	A	Chromatographic paper No. 1, manufactured in U.R.S.S. or usual filter paper (cylinder from roll 16 × 16 cm)	washed with PE
	2			
Lefort and Signol[35], 1955	1	A	Whatman No. 1 (2 × 26 cm)	dried at 105°
Hager[27,28], 1955, 1957	1	A	Schl. & Schull 2071 (cylinder)	dried at 50°
Shlyk[50], 1956	1	A	normal filter paper or paper No. 109-71 manufactured by Leningrad papermill No. 2	
Jiráček[31], 1957	1	A	Whatman No. 1 (25 × 46 cm or 6 × 46 cm)	
Šesták[19], 1958	1	D (A also)	Whatman No. 1	no special treatment, or impregnated with sucrose (0.18 g/ml) and dried

(Continued)

6	7	8	9
acetone	**PE** **benzene**		*Capsicum*
PE	**PE–benzene–Ac (10:1.5:1)**	time: 3–4 h 21° S.F.–S.P.: 35 cm	*Spinacia oleracea* *Rumex* sp. *Anthriscus* sp.
	***n*-hexane–*n*-propanol (99.5:0.5)**	+ 5° atmosphere of N_2	
ethanol PE ethanol–Ac	**benzene–PE (2:1)** **PE–96 % ethanol (14:1)** PE benzene–PE (3:1) 1st dim.: **benzene–PE (3:1)** 2nd dim.: **PE–96 % ethanol (14:1)**		
a piece of tissue is squeezed on the starting point acetone extract or PE extract	**PE–Ac–benzene (8.5:1:0.5)**	time: 1 h S.F.–S.P.: 18 cm	*Solanum lycopersicum* *Vitis vinifera* *Hordeum* sp. *Zea mays*
chloroform	**petrol (b.p. 100–140°)–benzene–chloroform–Ac–isopropanol (50:35:10:0.5:0.17)** **Me–PE** (?) PE (b.p. < 80°) Me	time: 24 h vacuum	*Avena* *Veratrum* *Buddleia* *Hedera* *Parthenocissus* *Corylus*
acetone extract	**toluene–carbon disulfide (10:3)** **toluene–carbon tetrachloride (1:1)** **PE–xylene–Ac (10:1.5:1)** PE–toluene–Ac (10:1.5:1) benzene–glycerol–chloroform (5:3:1) petrol–ethylene glycol–Ac (5:3:1) petrol–ethylene glycol–Me (3:2:1) PE–benzene–dioxan (10:1.5:0.5) PE–carbon tetrachloride–Ac (10:1:1)	S.F.–S.P.: 20–25 cm	*Triticum*
PE	**PE–benzene–chloroform–isopropanol (89:5:5:1)** **PE–benzene–*n*-propanol (94:5:1)** **benzene–PE–Ac (10:2.5:2)** **hexane–*n*-propanol (99.5:0.5)** **PE–chloroform–*n*-propanol (3:1:0.01)** benzene–PE–Ac–methanol (10:2.5:1:0.25) PE–benzene–*n*-propanol (88:10:2) hexane–*n*-propanol (99:1) PE–*n*-propanol (99.5:0.5) PE–chloroform (3:1)	+ 5°	*Triticum vulgare* *Secale cereale* *Pelargonium zonale* *Malva neglecta* *Lamium album* *Urtica urens* *Parthenocissus tricuspidata*

References p. 307/308.

TABLE

METHODS BASED ON THE PRINCIPLES AND "REVERSED-PHASE"

	2	3	4	5
[illegible]3, 1954	1	A	Whatman No. 4; Durieux 147 (25 × 3 cm)	moistened with water to 10% water content (8–15%)
SERCHI, MICHI AND RAPI[48], 1953	disc method		W 1 pressed filter paper	
SPITERI AND NUNEZ[56], 1952	1			impregnated with triglycerides, chloro- or bromonaphthalene
STRAIN[59], 1953	1	A	cellulose paper; Eaton-Dikeman 301, 0.075 or 0.125 cm thick; glass paper	(a) **adsorption on the surface of the glass or cellulose** without special treatment or dried at 100° (b) **separation on the surface of a fixed liquid:** moistened with water or with 10% solutions of polyhydroxy compounds (glycerol, sorbitol) in water, or moistened with glycerol or sorbitol in methanol, or with glycerol + glycine + urea, or glycerol + 10% methanol (c) **separation by partition between immiscible solvents** sprayed with 70, 80 or 90% methanol or dipped in these solutions and blotted (d) **reversed-phase method:** impregnated with 5% solution of vaseline

6	7	8	9
PE	**methanol 100°** ethanol propanol butanol monochlorobenzene chloroform benzene PE carbon disulfide carbon tetrachloride xylene	time: 20–30 min S.F.–S.P.: 12–15 cm spot distribution not influenced by temperature within the range 5–20° atmosphere satu- rated with H_2O	*Carex remota* *Tilia silvestris* *Anabaena cycadeae* *Bryales*
	stationary phase / *mobile phase*		
petrol–benzene–Me (9:1:3)	**H_2O** / **Ac** **petrol–Ac (7:3)** **Ac–petrol (9:1)** **benzene–chloroform (7:3)**		*Spinacia oleracea*
	ethyl ether / **Ac–petrol (9:1)** **Ac–petrol–H_2O (7:3:1)**		
	H_2O / chloroform benzene petrol butanol petrol–benzene satu- rated with ethanol (9:1) petrol–benzene (9:1) Ac–petrol–H_2O (7:3:1) petrol–benzene–Ac (7:1:2)		
	ethyl ether / ethanol–H_2O (4:1) alcohol (+ 3 drops of HCl)		
	ethyl acetate, pyridine, ligroin / chloroform, benzene, butanol		
	methanol **ethanol** **propanol**		
PE	(a) **PE–propanol (99.5:0.5)** PE	time: 20–40 min	various grasses (Poaceae)
	(b) **PE–propanol (99.5:0.5)** PE		
	(c) PE		
	(d) 80% methanol		

* For abbreviations and column headings, see Table I.

TABLE

CHROMATOGRAPHIC

	2	3	4	5
GRANICK AND GARCIA[23,24], 1952	1	A	Whatman No. 1 (50 × 15 cm)	
NUNEZ[18], 1954	1			impregnated with a mixture of triglycerides (0.5–4% olive oil in benzene), then dried at laboratory temperature
SAPOZHNIKOV, BRONSHTEIN-POPOVA, KRASOVSKAYA AND MAYEVSKAYA[16], 1956	1	A	chromatographic paper manufactured in U.R.S.S. (18 × 16 cm)	

reversed as follows (beginning from the original spot): carotenes–chlorophyll a–chlorophyll b–lutein–zeaxanthin–violaxanthin–neoxanthin[59].

FACTORS AFFECTING THE DISTRIBUTION OF SPOTS ON PAPER

The sequence of spots of chlorophylls and carotenoids on paper is determined first of all by the composition of the developing solvent mixture. The ratio of polar to nonpolar solvents in the mixture seems to be of the greatest importance. (The solvents may be arranged according to their polarity-index C:O—see, *e.g.*, PROCHÁZKA[42].) In pure nonpolar solvents only nonpolar carotenes are separated from the original spot, the other pigments either not moving at all or proceeding rather slowly. In solvent mixtures containing just a small quantity of polar solvents, the movement of chlorophylls, xanthophylls and pheophytins becomes greater. The relation between perfect separation and the ratio of polar and nonpolar solvents is clearly evident, especially in mixtures containing strongly polar solvents (*e.g.* alcohols); by increasing the percentage of strongly polar solvent, the "R_F" values of chlorophylls and xanthophylls increase. With mixtures containing larger quantities of strongly polar solvents as well as with pure polar solvents (acetone[5,8], ethanol[5], butanol[5]) all pigments move with the solvent front and are not separated at all.

vidence for this general statement may be found in the literature: *e.g.*, NOGUCHI[14] have reported that the "R_F" of chlorophyll a is equal to 0.07– min development with pure toluene, but with the mixture toluene–95% 1) the "R_F" is 0.47. When using nonpolar petroleum ether only carotenes [8,45], but xanthophylls and chlorophylls move with the mixture of er and benzene (1:3 or 1:2)[45,46], which is further away from the non- e table of solvents cited above[42] than petroleum ether. The influence of polarity of the solvent used is evident from the figure in the paper of he "R_F" of chlorophyll a (similar differences in "R_F" values can be

V*

SEPARATION OF CAROTENOIDS

6	7	8	9
PE	PE	atmosphere saturated with watervapours	*Tecoma radicans*
	ethanol–pyridine ethanol methanol propanol pyridine		*Solanum lycopersicum*
ethanol–acetone (1:3)	**benzene–PE (3:1)** **benzene–PE–96% ethanol (18:6:1)**	45 min	

* For abbreviations and column headings, see Table I.

observed with chlorophyll b and xanthophylls) is *ca.* 0.03 when developing with pure petroleum ether, but it is 0.27 with petroleum ether–acetone (20:1), and 0.87 (!) with petroleum ether–methanol in the same ratio (methanol being a more polar solvent than acetone). When developing with nonpolar petrol (b.p. 60° to 70°) chlorophylls remain at the starting point, while an addition of 1 part of ethyl ether (semi-polar solvent) to 20 parts of petrol brings the "R_F" of chlorophyll a to *ca.* 0.06, and an addition of 1 part of acetone (more polar than ethyl ether) raises the "R_F" to 0.44. Similarly the "R_F" of chlorophylls is increased by adding 0.5% propanol to pure petroleum ether[59]. Smaller amounts of the more polar solvent in a mixture (0.25 volume parts of methanol) produce higher "R_F" values than greater quantities (1 part) of the somewhat less polar solvent (acetone), the proportion of other solvents remaining unchanged[8]. Replacing two parts of acetone in the mixture petrol–acetone–benzene by 1 part of the more polar solvent—methanol—raises the "R_F" value of chlorophyll a from 0.38 to 0.9[38]. According to ref. 46, after addition of the polar solvent—ethanol (mixture of benzene–petroleum ether–96% ethanol in the ratio 3:1:0.33) the rate of movement of chlorophylls and xanthophylls is higher than with the mixture benzene–petroleum ether (3:1). When 0.03 volume parts of *n*-butanol, which is less polar than acetone, are added to the mixture petrol (b.p. 60–70°)–acetone (20:1) the "R_F" value of chlorophyll a decreases from 0.44 to 0.22[38].

The observations cited above seem to support the idea that a perfect separation of chlorophylls and xanthophylls would require suitable relative quantities of polar solvents in a mixture. Some results obtained by ASAMI[5] may be quoted against this opinion. He succeeded in resolving pigments with relatively nonpolar solvents—toluene or tetrachloromethane (or with xylene or benzene); the "R_F" values were essentially the same regardless of the fact whether these solvents were anhydrous or saturated with water. Some results of MÁRKUS[38] are also in opposition to the opinion mentioned above: on developing with the mixture petrol–chloroform (20:1), the "R_F" of chlorophyll a was found to be 0.15, while when chloroform was replaced by the more

References p. 307/308.

polar solvent ethyl ether, the "R_F" was only *ca.* 0.06. Contrary to expectation, addition of 1 part of toluene to the mixture petroleum ether–acetone (20:1) raised the "R_F" values of chlorophyll from 0.27 to 0.4. The situation therefore seems to be still very complicated and it would be rather difficult to draw definite conclusions from all such results because they are not very comparable.

Determination of constant "R_F" values of plastid pigments is impossible, for these values depend on the quantities of compounds analysed[5,7,8,14,19,27,28,32,35,39,49,50,52], on the duration of development[5,13,15,16], and, in the case of impregnated paper, on the amount of compound impregnated in the paper[40]. With increasing concentration of pigments in the sample analyzed, the "R_F" values increase, while they decrease with increasing quantity of impregnation compound, and with increase in developing time. The spots of chlorophylls usually have long diffusion "tails", sometimes observable only in U.V. light. The use of samples containing approximately the same quantities of pigments has been recommended in order to obtain comparable chromatograms.

When extracts from different plant species are chromatographed using one method, the sequence of spots and degree of separation may be different. This phenomenon is sometimes imputed to the presence of colourless liposoluble compounds in the extract. In some experiments resolution became more regular if purified extracts were used or if mixtures of pure isolated pigments were analysed[5,7,15,49].

The separation is also affected by the quality of paper[38], although according to some authors[45,50] the usual filter paper is quite adequate. In most cases moderately fast running papers have frequently been used (Whatman No. 1, Schleicher and Schüll 2043 b).

Some authors recommend transferring pigments to petroleum ether prior to spotting on paper. This technique is supposed to remove the greater part of undesirable material, especially hydrophilic pigments, from the extract[15,16,30,36,49,59]. In most papers, however, it is assumed that a concentrated extract can be spotted directly on paper. Some authors[35,52] have even squeezed a piece of plant tissue on the starting point. Usually, the sample is applied as a little round spot or as a streak[15,23,27,28,46,54,57].

The decomposition of pigments during developing is sometimes prevented by keeping the temperature between $+1^\circ$ and $+5^\circ$ [21,32,49,57], by impregnating the paper with sucrose[21,49,57], or by making use of an inert atmosphere in the chamber[21,57]. The chamber must always be kept dark.

USE OF THE METHOD

The method described has been used (in the communications mentioned above and in other papers) for qualitative and quantitative determination of pigments in lower and higher plants[17,18,30], for identification of pigments in those plant tissues where their presence is unusual, *e.g.* in bark and xylem[25,26], for studying preparations of plant material before extraction[6], for isolation of small quantities of pigments[12], for studying various factors affecting pigment synthesis in plants[27,29,47,50,51,54], for observation of genetic effects of X-rays[43,44], for genetic survey of varieties of rice[32,33], for analysis of

chlorophyllase activity[22,53,54,61], for studying the decomposition of pigments in sediments and muds[1], for determining the extent of smoke damage in forestry[39], as well as in food chemistry[19,20] and pharmacology[41,48].

Paper chromatography has been used in rare cases to separate the crystalline chlorophyll–lipoprotein complex into two components[2,13]. These components were separated by the ascending technique, on Whatman No. 1[2] or Toyo No. 50 paper[13], a mixture of picoline and water (1:1) being used in both cases.

Methods for separating various porphyrin pigments, some of which are precursors of chlorophylls or their degradation products are not discussed in this review.

CONCLUSION

More than 50 papers dealing with paper chromatography of plastid pigments have been published up to the present. These methods are summarized in the text or in the tables. A really critical comparison of the methods described in the literature cannot be presented in this review. Such a comparison would require a special study. All the techniques quoted above should be tested using uniform material and under constant conditions.

In spite of the lack of methods for the complete separation of all plastid pigments in a pure state, a number of techniques examined up to the present time have been used for solving diverse problems. The rapid advances that are being made in the development of this analytical procedure hold out promise that it will be very soon perfected.

The author is much indebted to Prof. Dr. J. V. Koštíř, Docent Dr. R. Řetovský, Dr. I. Šetlík, Dr. V. Jiráček, Prom. Biol. J. Květ, Prom. Chem. S. Černý and Dr. Bubeníková for scientific and linguistic assistance in the preparation of the manuscript.

REFERENCES

1 S. T. Andersen and K. Gundersen, *Experientia*, 11 (1955) 345.
2 D. R. Anderson, J. D. Spikes and R. Lumry, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 298.
3 S. Aronoff, *Chlorophyll, Technological Aspects*. Cyclostyle print, 1950, p. 35.
4 M. Asami, *J. Shiga Pref. Jun. Coll., Ser. A*, 1 (1951) 139.
5 M. Asami, *Botan. Mag. (Tokyo)*, 65 (1952) 217.
6 M. Asami, *J. Shiga Pref. Jun. Coll., Ser. A*, 2 (1953) 93.
7 M. Asami, *Mem. Ehime Univ. Sect. II (Science), Ser. A*, 2 (1955) 113.
8 L. Bauer, *Naturwissenschaften*, 39 (1952) 88.
9 G. Blaauw-Jansen, *Nature*, 174 (1954) 312.
10 W. G. Brown, *Nature*, 143 (1939) 377.
11 F. Bukatsch, *Mikrokosmos*, 44 (1954) 35.
12 S. Černý, *Studium polarografických vlastností lipofilních listových barviv*, Dissertation, Charles University, Prague, 1955.
13 Y. Chiba, *Arch. Biochem. Biophys.*, 54 (1955) 83.
14 Y. Chiba and I. Noguchi, *Cytologia (Tokyo)*, 19 (1954) 41.
15 R. Douin, *Rev. gén. botan.*, 60 (1953) 77.
16 R. Douin, *Congr. intern. botan., 8e Congr., Paris, 1954, Sect. 11/12*, p. 22.
17 R. Douin, *Compt. rend.*, 239 (1954) 76.
18 R. Douin, *Compt. rend.*, 243 (1956) 1051.

[19] A. FOUASSIN, *Rev. fermentations et inds. aliment.*, 9 (1954) 117.
[20] A. FOUASSIN, *Compt. rend. congr. intern. chim. ind., XXVIIe Congr., Bruxelles, 1954.*
[21] S. FREED, K. M. SANCIER AND A. H. SPORER, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 6006.
[22] R. S. GAGE AND S. ARONOFF, *Plant Physiol.*, 31 (1956) 477.
[23] R. GRANGAUD AND I. GARCIA, *Bull. soc. chim. biol.*, 34 (1952) 754.
[24] R. GRANGAUD AND I. GARCIA, *Compt. rend. soc. biol.*, 146 (1952) 1577.
[25] K. GUNDERSEN, *Nature*, 174 (1954) 87.
[26] K. GUNDERSEN AND J. FRIIS, *Botan. Tidsskr.*, 53 (1956) 60.
[27] A. HAGER, *Z. Naturforsch.*, 10b (1955) 310.
[28] A. HAGER, *Planta*, 48 (1957) 592.
[29] A. HAGER, *Planta*, 49 (1957) 524.
[30] R. HARDER AND W. KOCH, *Arch. Mikrobiol.*, 21 (1954) 1.
[31] V. JIRÁČEK, Personal communication (1957).
[32] Y. KATAYAMA AND S. SHIDA, *Japan. J. Breeding*, 6 (1956) 107.
[33] Y. KATAYAMA AND S. SHIDA, *Japan. J. Genetics*, 31 (1956) 299.
[34] H. KYLIN, *Z. physiol. Chem.*, 157 (1926) 148; 163 (1927) 229; 166 (1927) 39.
[35] M. LEFORT AND M. SIGNOL, *Rev. gén. botan.*, 62 (1955) 683.
[36] E. F. LIND, H. C. LANE AND L. S. GLEASON, *Plant Physiol.*, 28 (1953) 325.
[37] H. F. LINSKENS, *Strukturgebundene Farbstoffe*, in *Papierchromatographie in der Botanik*, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, pp. 197–202.
[38] L. MÁRKUS, *Agrokémia és Talajtan*, 1 (1952) 291.
[39] J. MÜLLER, *Naturwissenschaften*, 44 (1957) 453.
[40] G. NUNEZ, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 411.
[41] F. D. PICKEL, J. J. SCANLAN AND R. HEGGIE, *Drug Standards*, 22 (1954) 173.
[42] Ž. PROCHÁZKA, *Chemie (Prague)*, 9 (1957) 736.
[43] G. RÖBBELEN, *Planta*, 47 (1956) 532.
[44] G. RÖBBELEN, *Naturwissenschaften*, 44 (1957) 288.
[45] D. I. SAPOZHNIKOV, I. A. BRONSHTEĬN AND T. A. KRASOVSKAYA, *Biokhimiya*, 20 (1955) 286.
[46] D. I. SAPOZHNIKOV, I. A. BRONSHTEĬN-POPOVA, T. A. KRASOVSKAYA AND A. N. MAYEVSKAYA, *Fiziol. Rastenii, Akad. Nauk S.S.S.R.*, 3 (1956) 487.
[47] D. I. SAPOZHNIKOV, T. A. KRASOVSKAYA AND A. N. MAYEVSKAYA, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, 113 (1957) 465.
[48] G. SERCHI, P. MICHI AND G. RAPI, *Chimica (Milan)*, 8 (1953) 79.
[49] Z. ŠESTÁK, *Československ. biol.*, 7 (1958) 153.
[50] A. A. SHLYK, *Metod mecenych atomov v izucenii biosinteza chlorofilla, Izdat. Akad. Nauk Belorusskoi S.S.R.*, Minsk, 1956, pp. 121–132.
[51] A. A. SHLYK, T. N. GODNEV, R. M. ROTFARB AND J. P. LYACHNOVIC, *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, 113 (1957) 1324.
[52] C. SIRONVAL, *Arch. intern. physiol.*, 41 (1953) 563.
[53] C. SIRONVAL, *Physiol. Plantarum*, 7 (1954) 523.
[54] C. SIRONVAL, *I.R.S.I.A. Compt. rend. recherches*, No. 18 (1957) 93.
[55] J. H. C. SMITH AND A. BENITEZ, *Chlorophylls: Analysis in Plant Materials*, p. 142–196, in *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. IV, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, pp. 190–192.
[56] J. SPITERI AND G. NUNEZ, *Compt. rend.*, 234 (1952) 2603.
[57] A. H. SPORER, S. FREED AND K. M. SANCIER, *Science*, 119 (1954) 68.
[58] H. H. STRAIN, *Anal. Chem.*, 21 (1949) 75.
[59] H. H. STRAIN, *J. Phys. Chem.*, 57 (1953) 638.
[60] M. TSWETT, *Ber. deut. botan. Ges.*, 24 (1906) 384.
[61] J. B. WOLFF AND L. PRICE, *Plant Physiol.*, 31 Suppl. (1956) XXXI.

Received January 26th, 1958

DISPOSITIF POUR L'ENREGISTREMENT AUTOMATIQUE CONTINU DE LA RADIOACTIVITÉ DES CHROMATOGRAMMES SUR PAPIER

JACQUES VIGNE ET SERGE LISSITZKY

Laboratoire des isotopes du Centre de Lutte contre le cancer, Hôpital Ste Marguerite, et Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Médecine et Pharmacie, Marseille (France)

De nombreux dispositifs d'enregistrement automatique de la radioactivité sur les chromatogrammes utilisant un compteur β à fenêtre mince ont été proposés.

Leur principe repose sur le déroulement de la bande de papier devant le compteur. Le courant de sortie de ce dernier est envoyé dans un intégrateur qui transmet ses renseignements à un milliampèremètre enregistreur où s'inscrit la courbe traduisant la variation de la radioactivité en fonction de la distance. Le problème essentiel posé pour la réalisation de ces appareils est celui du synchronisme entre la vitesse de déroulement du chromatogramme et celle du papier du milliampèremètre. Il est parfaitement assuré si chromatogramme et papier enregistreur sont solidarisés[1-4], mais alors il est difficile de réaliser de nombreux radiochromatogrammes successivement. Dans des dispositifs plus complexes[5,6] le chromatogramme est enroulé sur un tambour par une extrémité, un poids étant accroché à l'autre bout après réflexion sur un autre cylindre où il défile devant le compteur. La tension exercée par le poids assure la géométrie, le déroulement du chromatogramme étant obtenu par un dispositif à échappement commandé par un compteur de temps et dont l'espacement des butées est tel qu'à chaque mouvement d'échappement, des sections consécutives de 0.5 cm sont exposées au compteur. Le déroulement de la feuille du milliampèremètre est réglé à la même vitesse.

Si la bande de papier est entraînée par un moteur dont le mouvement est synchrone de celui du cylindre enregistreur[7] on peut obtenir un enregistrement continu d'un grand nombre de chromatogrammes mais alors une différence de marche des deux éléments est le plus souvent observée, qui rend difficile le repérage des taches radioactives par rapport à l'entraîneur.

Le dispositif que nous avons mis au point, pallie cet inconvénient en rendant solidaire, au moyen d'un engrenage, le mouvement du chromatogramme de celui de la feuille du milliampèremètre. Il permet l'enregistrement continu d'un grand nombre de chromatogrammes en les adaptant bout à bout à l'aide de cellophane gommée. La précision des données quantitatives obtenues après planimétrie, compte tenu de toutes les opérations (y compris la chromatographie), est supérieure à 5%.

Bibliographie p. 313.

DESCRIPTION DE L'APPAREIL

Il forme un ensemble se fixant sur la face avant du milliampèremètre enregistreur* grâce à 3 vis W (Fig. 1). Chaque pièce le constituant, réalisée en laiton chromé, est démontable pour permettre une facile décontamination éventuelle. Le mouvement du chromatogramme est rendu solidaire de celui du cylindre enregistreur.

Pour réaliser cet entraînement on a utilisé le bouton de l'enregistreur servant à faire dérouler le papier à la main, l'entraînement se faisant au moyen des ergots E. Schématiquement (Fig. 2) l'appareil se compose d'une fente F réglable par un bouton L, devant laquelle se déplace le chromatogramme (largeur 4 cm) entraîné par le

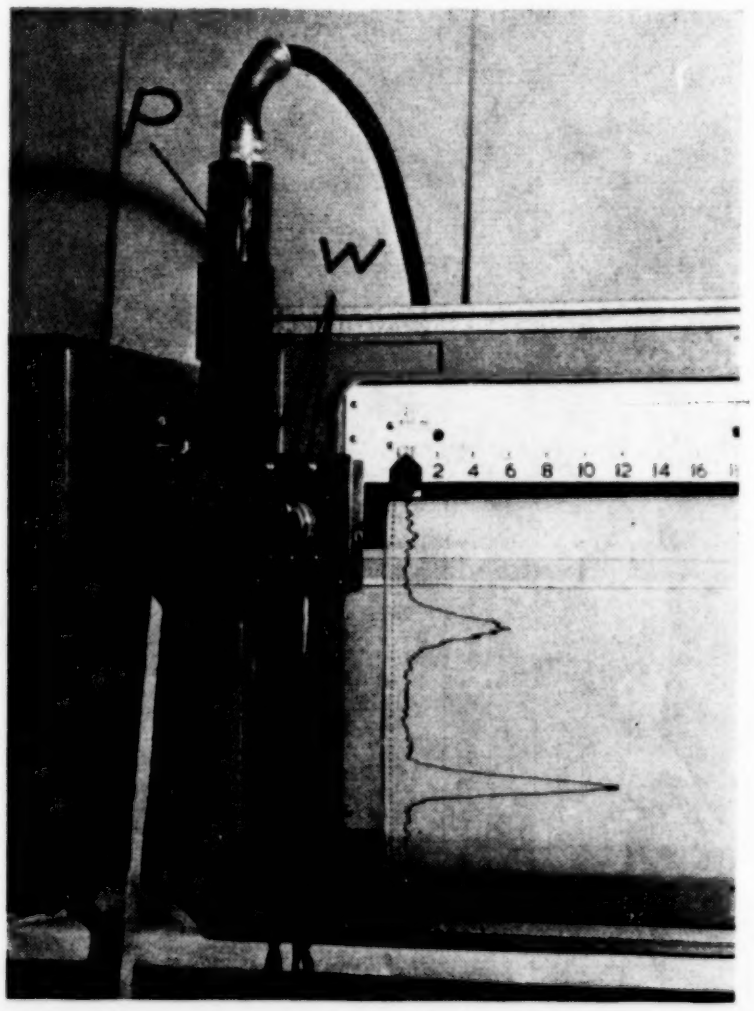


Fig. 1. Photographie du dispositif monté sur l'enregistreur. W = vis de fixation au bati de l'enregistreur; P = préamplificateur.

cylindre C sur lequel il est appliqué par les galets de bakélite G. Le papier enregistreur et le chromatogramme peuvent être mûs séparément grâce aux boutons A et B qui commandent les mouvements de l'un et de l'autre et que l'on peut rendre solidaires dans la position voulue au moyen de la vis V. La diamètre de la portée du cylindre C a été calculé en fonction des engrenages coniques de renvoi, de manière à ce que les deux feuilles se déroulent à la même vitesse. La juxtaposition de nombreux chromatogrammes est réalisée par collage bout à bout de ceux-ci, avec une bande de cellophane gommée. L'extrémité antérieure d'un chromatogramme, précédée d'une bande de même largeur destinée à son introduction dans l'appareil, est placée en deçà de la

* Philips PR 2200 A/21.

Bibliographie p. 313.

fente et le bouton B est solidarisé au cylindre C. Le compteur est alors mis sous tension, l'intégrateur et le milliampèremètre branchés.

On peut obtenir des vitesses de déroulement variables de 0.25, 0.50, 1 et 2 cm/min.

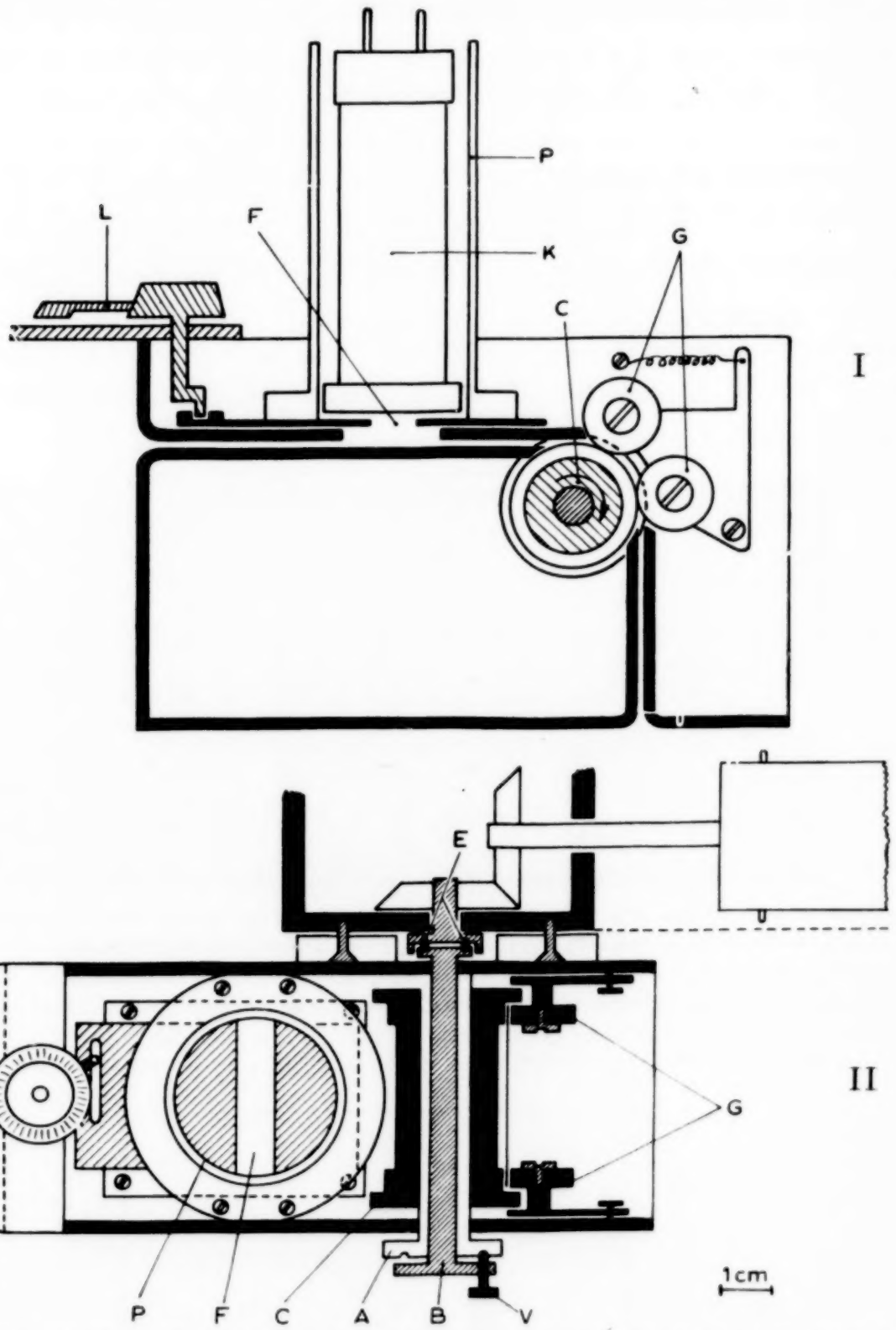


Fig. 2. Schéma du dispositif utilisé pour l'enregistrement automatique de la radioactivité sur un chromatogramme. I = coupe frontale ; II = vue supérieure (coupe partielle). A: bouton d'entraînement du cylindre C; B: bouton destiné à solidariser le mouvement de C de celui du cylindre du milliampèremètre enregistreur; C: cylindre d'entraînement du chromatogramme; E: ergots d'entraînement du bouton B par le cylindre enregistreur; F: fente; G: galets appliquant le chromatogramme sur le cylindre C; K: compteur à fenêtre mince; L: levier de réglage de la largeur de la fente; P: protection du compteur; V: Vis.

La largeur de la fente S peut être définie en fonction de la vitesse de déroulement V et de la constante de temps de l'intégrateur T grâce à la relation $S = V\,(4T)$[3]. Sur la base de cette expression on peut calculer les largeurs de fente compatibles avec une réponse à 98.1%, pour des vitesses variées et pour une sensibilité donnée[3].

Bibliographie p. 313.

D'autre part la sensibilité de l'intégrateur pouvant être modifiée dans un rapport de 1 à 10 et le milliampèremètre muni d'une gamme de mesure, on disposera d'un domaine de mesure assez grand pour permettre une exploration adaptée à des activités assez largement variables du chromatogramme.

RÉSULTATS

La Fig. 3 représente un enregistrement obtenu à partir du chromatogramme d'un milieu d'incubation de ^{131}I-3,5-diiodotyrosine en présence de coupes de foie de rat. On notera la régularité de la ligne de base correspondant au mouvement propre du compteur.

La planimétrie des surfaces au-dessus de cette ligne permet d'obtenir des données quantitatives sur la répartition de la radioactivité dans les différents composés séparés par chromatographie.

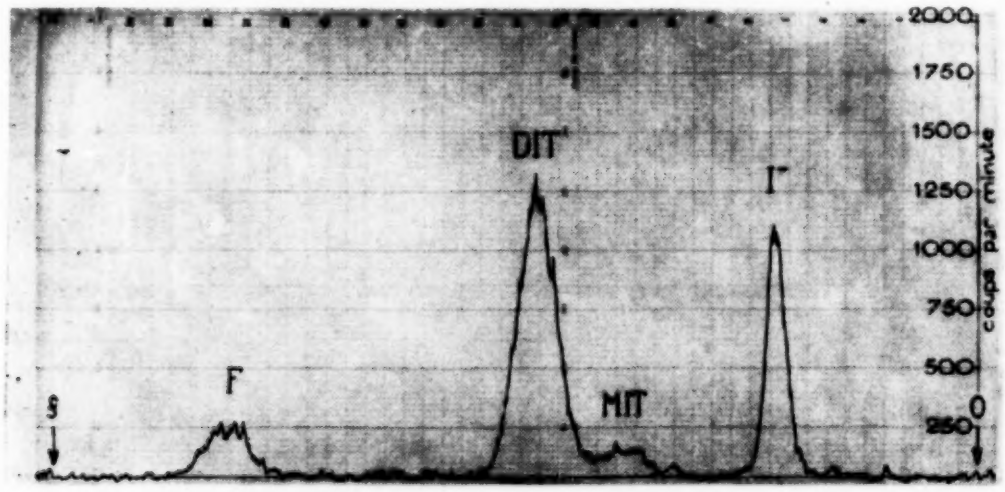


Fig. 3. Enregistrement d'un chromatogramme en *n*-butanol–acide acétique–eau (78:5:17) d'un milieu d'incubation de ^{131}I-3,5-diiodotyrosine (DIT) en présence de coupes de foie de rat montrant la formation d'iodures (I^-), de 3-iodotyrosine (MIT) et de dérivés d'oxydation de la chaîne alanine (F). On a déposé sur le papier une radioactivité totale de 0.1 μC. Vitesse de déroulement: 60 cm/h. Constante de temps: 10 sec. Largeur de la fente: 2 mm. O = zone de dépot de la goutte (10 μl) du mélange chromatographié. f = front atteint par le solvant (48 cm).

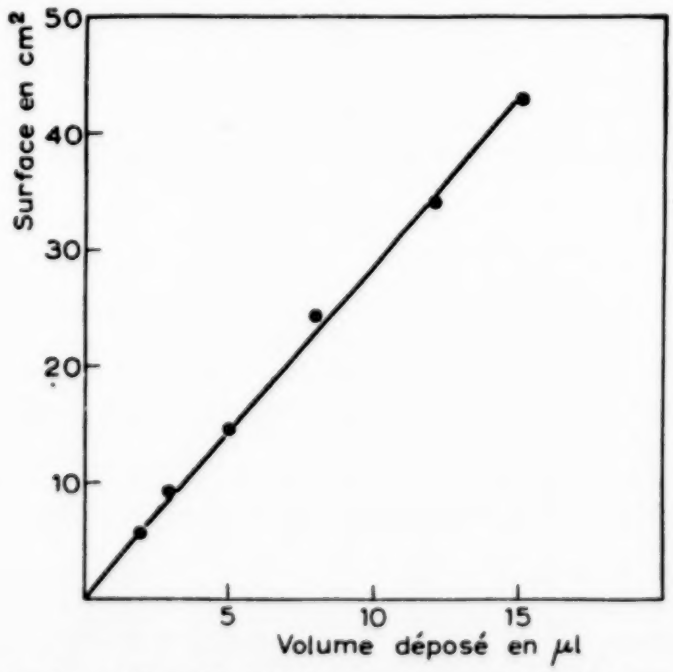


Fig. 4. Proportionnalité entre la radioactivité chromatographiée et les surfaces obtenues par planimétrie des pics correspondants sur les enregistrements. Chaque μl de ^{131}I-3-iodotyrosine correspond à $1.4 \cdot 10^{-3}$ μC (voir texte). Chaque point de la courbe représente la moyenne de trois essais.

Bibliographie p. 313.

La proportionnalité des surfaces mesurées en fonction de quantités croissantes de radioactivité chromatographiée, a été vérifiée dans des expériences du type de celle-ci: des volumes de 2 à 15 μl d'une solution de ^{131}I-3-iodotyrosine (1 μl = $1.4 \cdot 10^{-3}$ μC = 222 impulsions/min) sont déposés sur une feuille de papier Whatman 1 et développés en *n*-butanol–acide acétique–eau (78:5:17) pendant 12 heures. Après séchage, les bandes correspondantes à chaque prise d'essai sont découpées, collées bout à bout et l'enregistrement effectué. La planimétrie des surfaces obtenues permet de tracer la courbe de la Fig. 4, montrant la proportionnalité excellente entre les quantités de radioactivité chromatographiées et les surfaces mesurées.

La précision calculée sur un grand nombre d'expériences est toujours supérieure à 5%, compte tenu de l'ensemble des opérations chromatographiques.

RÉSUMÉ

Un dispositif simple permettant l'enregistrement automatique continu de la radioactivité sur de nombreuses bandes de papier chromatographique et utilisant un compteur β à fenêtre, est décrit.

SUMMARY

A description is given of a simple apparatus which makes possible the continuous automatic registration of the radioactivity of a large number of paper chromatograms, an end-window β-counter being used.

BIBLIOGRAPHIE

1 R. H. MÜLLER ET E. N. WISE, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 207.
2 W. J. FRIERSON ET I. W. JONES, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1447.
3 R. R. WILLIAMS ET R. E. SMITH, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 77 (1951) 169.
4 P. BONET-MAURY, *Bull. soc. chim. France*, (1953) 1066.
5 F. P. W. WINTERINGHAM, A. HARRISON ET R. G. BRIDGES, *Nucleonics*, 10, No. 3 (1952) 52.
6 S. SOLOWAY, F. J. RENNIE ET DEWITT STETTEN, JR., *Nucleonics*, 10, No. 4 (1952) 52.
7 D. V. COHN, G. W. BUCKALOO ET W. E. CARTER, *Nucleonics*, 13, No. 8 (1955) 48.

Reçu le 19 mars 1958

CHROMATOGRAPHY ON PAPER IMPREGNATED WITH ION-EXCHANGE RESINS

III. THE SEPARATION OF SOME CATION MIXTURES

M. LEDERER
Laboratoire Curie, Institut du Radium, Paris (France)

In the second part of this series[1] we have established the relation $x\text{pH} = R_M +$ constant for the elution of cations from filter paper impregnated with colloidal Dowex-50 resin. However, after proving it experimentally with La^{+++} and Ni^{++} ions, we have only applied it to the separation of selenite and tellurite with numerous developing acids.

In this paper we shall describe some applications of the above equation in choosing a suitable concentration of developing acid and thus in predicting the conditions under which ion-exchange separations may be effected when using only the cation–H^+ equilibrium without any complexing agents. In the above equation x represents the valency of the cation, and, as is well known already, the lower the charge on an ion the easier its displacement from the resin by hydrogen ions. The significance of this is best illustrated by plotting R_F against pH when, as shown in Fig. 1, telluryl, Ni^{++} and La^{++} (experimental data from[1]) change their R_F values logarithmically with the pH.

In this work the paper was impregnated with Dowex-50, as described in the two previous communications[1,2], and HCl at various concentrations was used throughout this work as developing acid. Usually, the chromatogram was 24 cm long with the sample applied as a thin line 4 cm from one end, and the paper was developed by the ascending method.

The separation Cu–Cd

From electrophoretic and paper chromatographic data it is known that Cd exists in dilute HCl as an equilibrium of $CdCl^+$, $CdCl_2^0$, and $CdCl_3^-$, while Cu^{++} remains uncomplexed in concentrations of HCl up to 1 N (at least). It may be presumed that Cu^{++} will thus have R_F values essentially similar to those of Ni^{++} in Fig. 1 since its radius and hydration are alike. Thus, all that is required to predict a good separation is to look for a concentration of HCl where Cu^{++} stays well behind a monovalent cation such as $CdCl^+$. A concentration between 0.2 N and N would fulfill these conditions. Thus 0.1 N, 0.3 N, 0.5 N and 0.7 N were tried; they gave the chromatograms shown in Fig. 2. The best separation was in 0.3 N HCl or 0.5 N HCl.

Separations of some trivalent and tetravalent ions

(a) *Behaviour of Fe(III).* Ferric iron behaves like an intermediate between a

References p. 316.

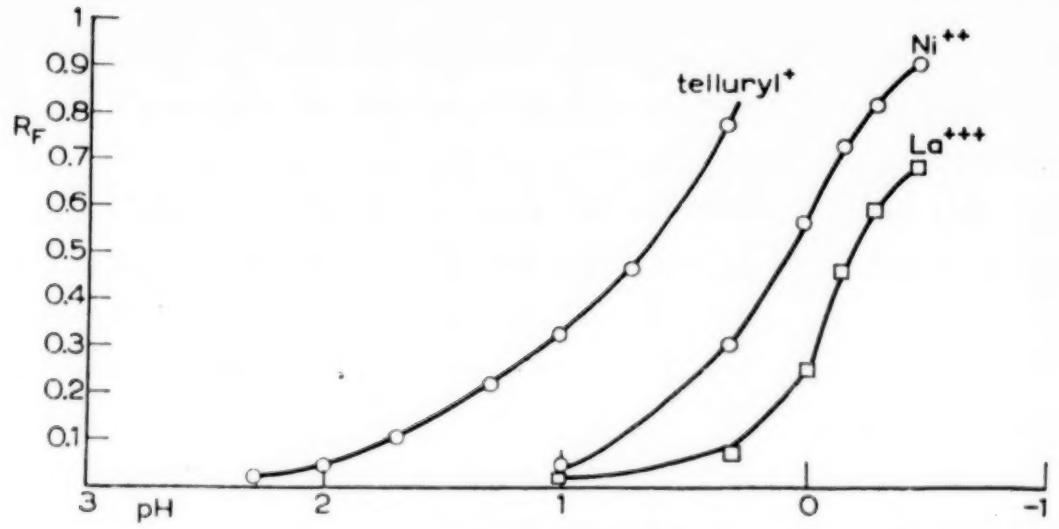


Fig. 1. The R_F–pH relationship of typical mono-, di- and tri-valent cations when eluted with H_2SO_4 (data from ref.[1]).

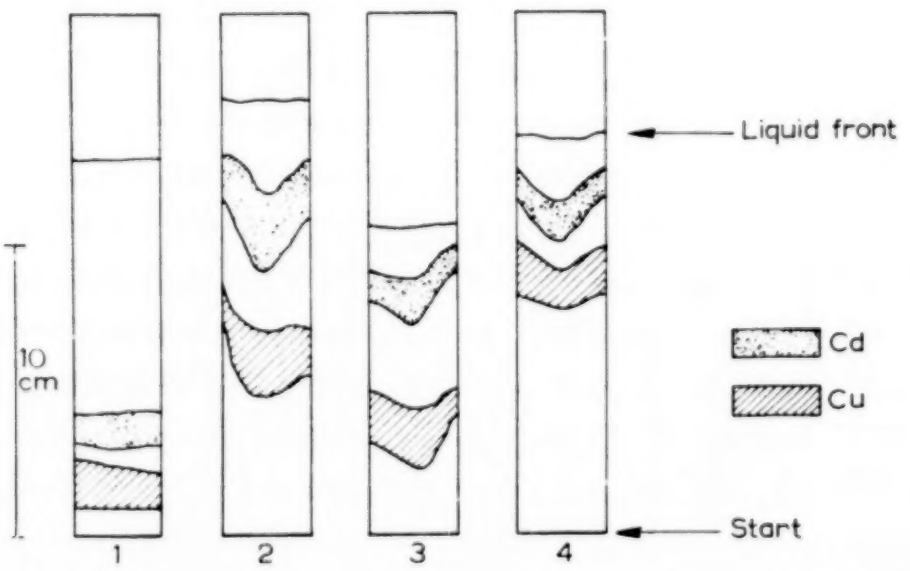


Fig. 2. Separation Cu–Cd on Dowex-50 paper with (1) 0.1 *N* HCl, (2) 0.3 *N* HCl, (3) 0.5 *N* HCl, (4) 0.7 *N* HCl. All paper strips were dried and dipped in $(NH_4)_2S$ solution to reveal dark CuS and yellow CdS.

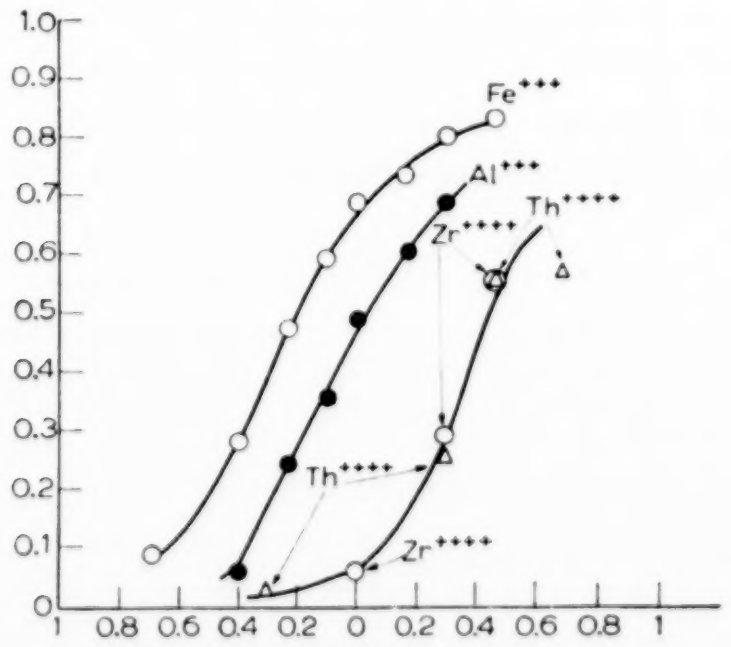


Fig. 3. The R_F–pH relationship of tri- and tetra-valent cations when eluted with HCl. Fe^{+++} has a curve rather like a divalent cation, presumably owing to the preponderance of $FeCl^{++}$ ions. Ti(IV), not shown here, precedes Fe(III) and is also not present as Ti^{+++}.

References p. 316.

divalent and trivalent cation in dilute HCl, presumably because an equilibrium between $FeCl^{++}$ and Fe^{+++} exists in the concentrations examined. The R_F–pH curve is thus well removed from that of Al^{+++}, as shown in Fig. 3.

(b) *Th^{++++} and Zr^{++++}* seem to be true tetravalent cations, with respect to an ion exchanger at least, and move considerably slower than trivalent ions such as Ce^{+++} and Al^{+++}; their R_F–pH curves coincide completely, as shown in Fig. 3.

(c) *Ti^{++++}*, on the other hand, moves well ahead of Fe(III), indicating considerable complexing with HCl.

To confirm our findings we have carried out some separations of analytical or radiochemical interest, which are shown in Fig. 4.

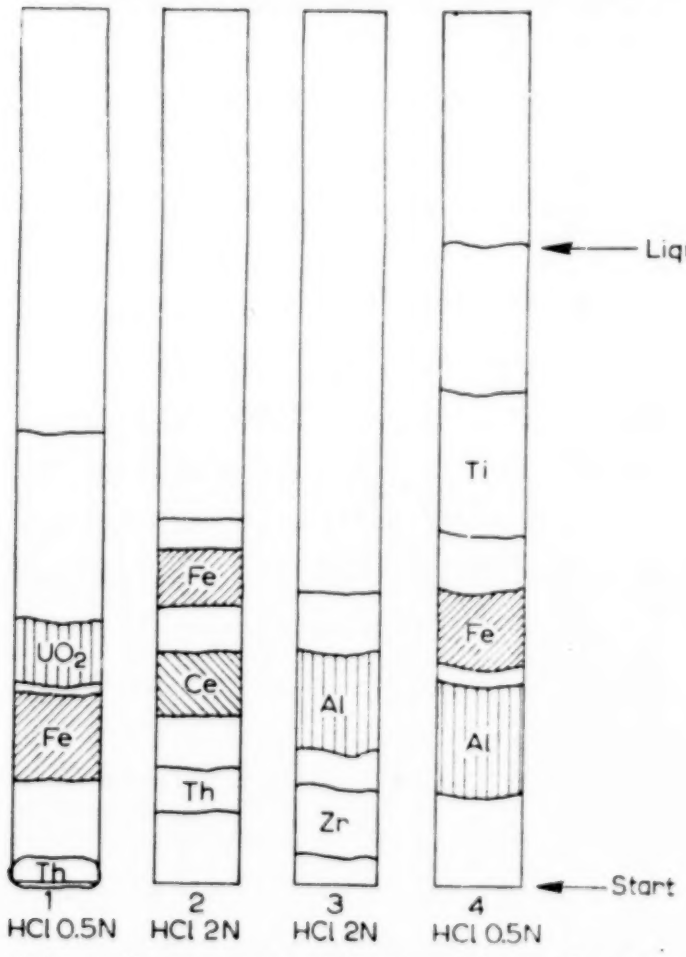


Fig. 4. Some successful separations of tetravalent cations from di- and tri-valent cations.

(d) *Th–Fe(III)–UO_2^{++}* are readily separated with 0.5 *N* HCl with a short development. After drying, the paper is dipped into an alcoholic ammoniacal solution of oxine, which yields a brown band for Th, a black one for Fe, and an orange one for UO_2^{++}.

(e) *Th–Fe(III)–Ce(III)* separate in this order in 2 *N* HCl with oxine as in (d). Ce yields a pale brown band. Other rare earths can similarly be separated from Th.

(f) *Al–Zr* separate also in 2 *N* HCl. Oxine yields a colourless band with green fluorescence in ultraviolet light for Al and an orange band (green in ultraviolet light) for Zr.

(g) *Ti–Fe–Al* separate in 0.5 *N* HCl. This separation required a longer development than the three preceding ones since their R_F differences are smaller even in the optimum region. Oxine yields an orange band for Ti invisible in the ultraviolet light.

SUMMARY

Ion-exchange papers (Dowex-50) are used, with HCl as developing solvent, for the separations Cu–Cd, Th–Fe–UO_2^{++}, Th–Ce–Fe, Al–Zr and Ti–Fe–Al. The concentration of HCl to yield a separation may be predicted by using the equation $x\text{pH} = R_M + \text{constant}$.

REFERENCES

1 M. LEDERER AND S. KERTES, *Anal. Chim. Acta*, 15 (1956) 226.
2 M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 12 (1955) 142.

Received August 6th, 1957

AMINO ACID ANALYSIS BY HORIZONTAL PAPER CHROMATOGRAPHY

JACQUELINE CHARTIER, F. W. VAN KLAVEREN AND G. VAILLANCOURT

Fisheries Research Board of Canada, Technological Station, Grande-Rivière, P. Q. (Canada)

INTRODUCTION

The advantages of circular paper chromatography have been discussed by several authors[1–5] and could be confirmed by our initial trials, notably with respect to well defined sharp bands obtained with this method. They contrast favourably with the diffuse spots frequently observed with the two-dimensional technique[6]. Besides, the circular technique permits the comparison of different proteins or different hydrolytic fractions on one and the same paper[7,8]. GIRI and co-workers[8] had achieved this on ordinary chromatographic paper but the K.C.T. technique[9], in which a paper with five machine made slits is used, constitutes an additional improvement.

In confirmation of GIRI and co-workers[5] it was found that the solvent system *n*-butanol–acetic acid–water (4:1:5) causes a number of amino acids to run in pairs so that nineteen amino acids are separated into nine groups. These authors proposed two methods for separating the groups into their individual constituents. The first one[5] consists of rechromatographing the sample up to 6 times, the second one[10] of eluting the group bands by capillary action onto another paper and developing same with another solvent, *e.g.* pyridine–water (80:20), pyridine–isoamyl alcohol–water (10:10:7) or pyridine–amyl acetate–water (10:5:5). KRISHNAMURTHY AND SWAMINATHAN[11] had proposed a third method, in which they used five different solvent systems, determining from each chromatogram only those amino acids which are separated into a single and homogeneous band. RAO AND WADHWANI[12,13] also use several solvent systems but could reduce the number of these to three by adopting GIRI's method of rechromatography.

The conventional circular method, in which the spot is applied near the centre and in which the solvent system *n*-butanol–acetic acid–water (4:1:5) is employed did in our experience not separate the lysine–histidine group adequately from the arginine–asparagine group and even the next band, aspartic acid–glycine–serine frequently was too near the preceding one. This point is of particular importance, because the location of the groups which are to be eluted and chromatographed with another solvent system can only be determined from their ninhydrin-developed counterparts on another segment of the circle, but the calendering of the paper often produces a solvent front of oval shape instead of an ideal circle, so that instead of the desired band only, parts of the neighbouring bands also are easily cut out. Probably for similar

References p. 326.

reasons GIRI[14] emphasized the need for increasing the size of filter paper from 15 to 35 cm in one of his later publications.

Neither modifications in the size of the paper tongue (0.3 to 1.0 cm) nor replacing same by a capillary[9], alleviated the difficulty mentioned above. Thus the problem was formulated as follows: (a) to find a solvent system and other conditions, which would separate 18 amino acids into a small number of well defined and well separated groups, (b) in which the amino acids are distributed in such a pattern that they can be easily separated by using not more than two other solvent systems, so that a maximum number of groups can be eluted and chromatographed on one and the same K. C. T. paper.

PRELIMINARY EXPERIMENTS

Initial trials with butanol–acetic acid–water (4:1:5), *tert.*-butanol–formic acid–water (75:0.8:24.2), collidine–water, lutidine–water, phenol–water and phenol–isopropyl alcohol–water (70:5:25) failed to meet all requirements postulated above. The failure with phenolic systems, in spite of vacuum distillation, NaCN-addition to the chamber, purification with petroleum ether–water[15], and aluminium treatment[16] was especially disappointing, since these solvents produce by the ascending or descending technique R_F values which differ widely from those obtained with other solvent systems. Initial trials with butanone–water appeared promising, but the highest R_F values were so low that even after three rechromatograms the groups were too crowded. Pyridine additions to this system gave better results but the solvent system *n*-butanol–butanone–water–ammonia 17 *N* (5:3:1:1), proposed by WOLFE[17] for two-dimensional procedures appeared most suitable and was used for a more detailed investigation.

Chemicals

n-Butyl alcohol, AnalaR, B.D.H.
2-Butanone, Eastman Kodak.
Ammonia, concentrated, analytical quality.
tert.-Butanol, Eastman Kodak.
2,4-Lutidine, refined, Koopers Co., Ltd., Pittsburgh, Pa.
Formic acid, 85–90%, Fisher Certified Reagent.

All organic solvents, except formic acid, were redistilled, those of boiling points over 100° *in vacuo*.

Solvent systems

n-Butanol–butanone–water–ammonia conc. (5:3:1:1, v/v), *tert.*-butanol–formic acid–water (75:0.8:24.2, v/v) and lutidine–water (2:1, v/v) give one phase only when their constituents are mixed.

Paper

Sheets of Whatman chromatographic paper No. 1 were used for the separations into 6 groups. They were washed according the procedure of KAY and co-workers[18] and

References p. 326.

cut into circles of 34 cm diameter. With a double razor three slits are made, producing two centre segments, each with an angle of 30° (Fig. 1).

The centre slit should run parallel to the direction in which the paper is calendered

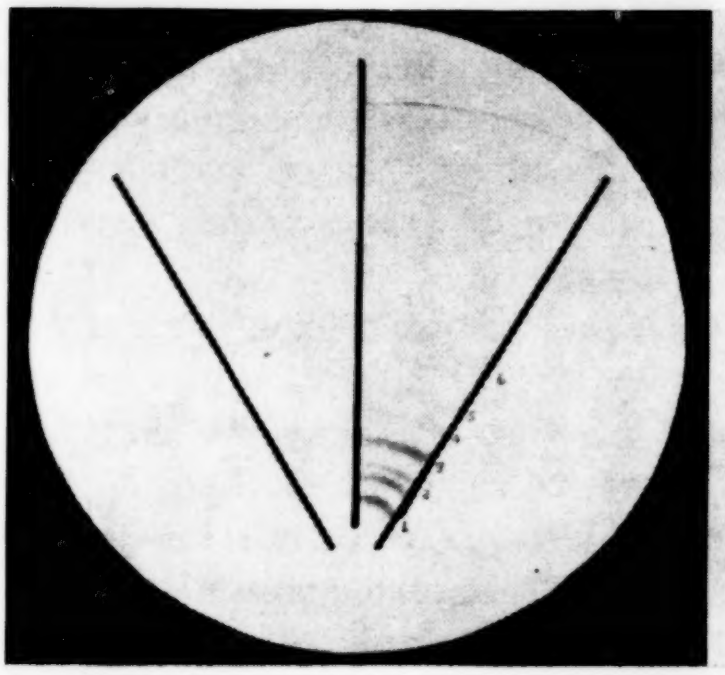


Fig. 1

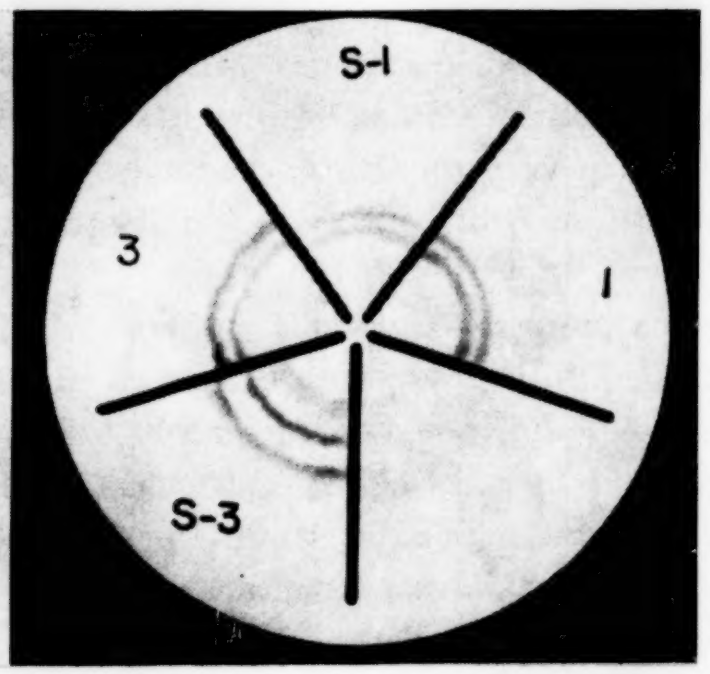


Fig. 2a

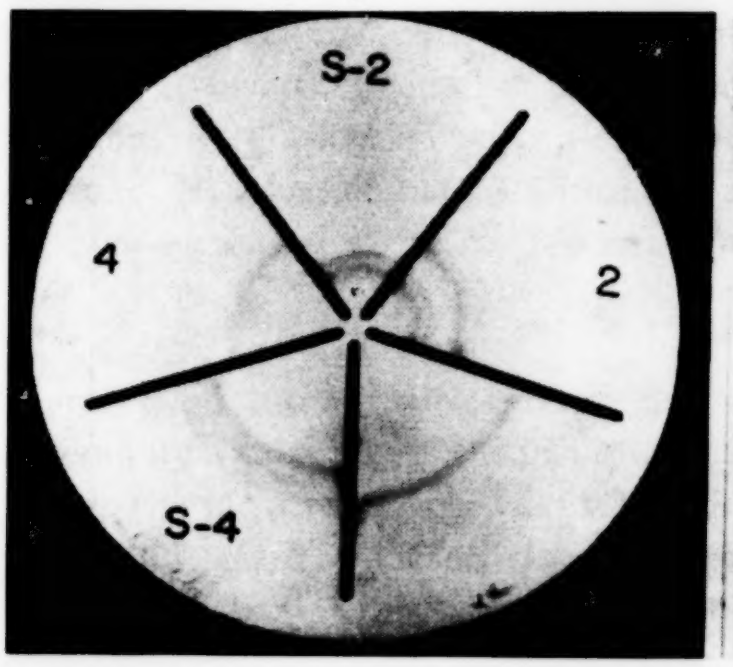


Fig. 2b

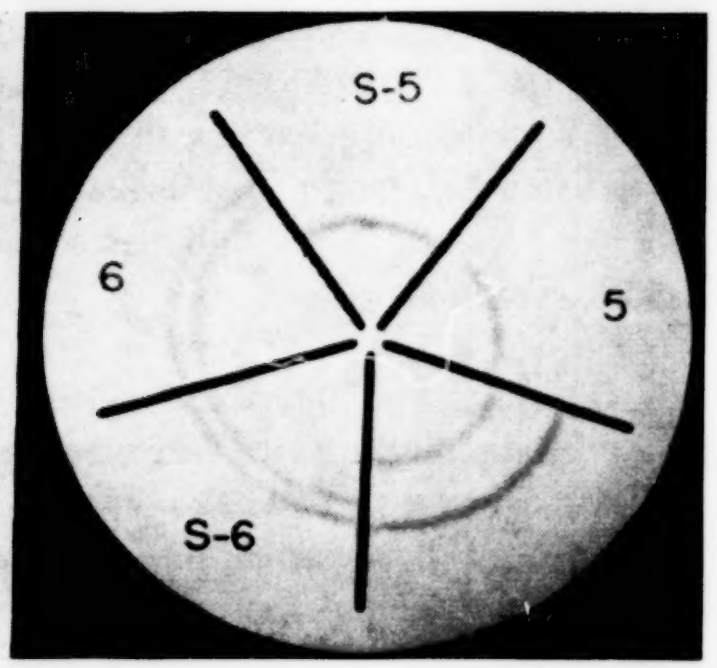


Fig. 2c

Figs. 1, 2a, 2b and 2c. Separation of a protein hydrolysate into six groups and of these into their individual amino acids. 2a: S1, glutamic and aspartic acid; S3, histidine, alanine, serine. 2b: S2, lysine, arginine, glycine; S4, valine, methionine, tyrosine. 2c: S5, threonine; S6, leucine, isoleucine, phenylalanine. The figures 1 to 6 indicate the groups, S1–S6 the corresponding pure standard samples. K.C.T.-paper 2a and 2c have been developed with BuOH:HCOOH:H_2O, 2b with lutidine:H_2O. Experiments 2a and 2c can be carried out on one paper, the addition of standard samples on the same paper not being necessary, once the technique has been established.

in order to avoid complications from the oval shape of the chromatogram.

Subseparation of the groups into individual amino acids was carried out on Whatman No. 1, K.C.T. paper of 26.5 cm diameter which contains 5 equally spaced radial slits (Figs. 2, a, b and c).

Investigations

In order to find such conditions as to produce the widest possible space between the

TABLE I

VARIOUS MODIFICATIONS OF THE CIRCULAR AND TRIANGULAR METHOD

Expt.	*Method*	*Amount of solvent in ml**	*Number of runs*	*Length of runs = R_F 100 in mm*	*Total time required at 18–20°*	*Results*
A	Circular	35	1	140	12	Groups too crowded
B	Circular	35	2	130	24	Better than A
C	Circular	35	4	145	48	Better than A and B
D	Circular, but paper divided by 4 slits	35	1	135	13	Worse than A
E	*ditto*	35	2	150	26	Worse than B
F	*ditto*	35–12	1	160	13	Inadequate for fast moving bands
G	*ditto*	35–12	2	150	26	Inadequate for fast moving bands
H	Triangular, angle 37°	35	1	200	12	Crowded, but spacing more regular than above
J	Triangular, angle 45°	35	2	220	39	Quite good
K	Triangular, angle 37°	35–1	2	215	37	Inadequate for group of medium R_F-values
L	Triangular, angle 45°	35–5	2	180	30	Inadequate for group of medium R_F-values
M	Triangular, angle 42°	35–15	2	180	26	Widening of bands reduces spaces between them
N	Triangular, angle 30°	35	2	238	50–60	Satisfactory, 5 mm or more between the 6 groups

*The first figure indicates the amount of developing solvent. The second one additional amounts, put in separate dishes.

six groups obtained with the solvent system *n*-BuOH–2-butanone–NH_4OH–H_2O, various modifications of the horizontal technique were tried (Fig. 4 and Table I).

These tests permit the following conclusions: With the circular method proposed by GIRI two rechromatograms are required as a minimum (A, B). Four rechromatograms (C) give the best results as regards separation but the arcs of the fast moving groups extend to more than 15 cm, which is a detrimental factor for the capillary elution. This difficulty may be overcome by cutting the group bands in half and eluting each of them separately, which however constitutes a loss of time.

When the circular method was modified by dividing the paper into four equal segments, similar to the K.C.T.-technique, lower R_F values were obtained than with the GIRI-technique. Saturation of the atmosphere by putting dishes with additional solvent in the chamber increased the R_F values, but some bands widened and the intervals were reduced. GANGULI[21] had proposed to modify the circular technique by putting the starting point near the periphery, which increases the absolute length of the run. In order to prevent the widening of the bands into dimensions which render capillary elution impractical, two triangular segments were made in the paper (Fig. 1). Saturating the atmosphere by placing additional solvent in the cabinet produced also with this modification wide bands and small spaces in between (K, L, M). The best separations were obtained with a segment angle of 30° resulting in an R_F 100 of 240 mm (C, N). This confirms experiment J in which already quite satisfactory spacing was observed and in which R_F 100 was equal to 220 mm.

Method

The separation into 6 groups is effected in a wooden box, 37.5 × 37.5 × 5 cm, which is covered by a glass plate. The inside and the upper rim are impregnated with molten paraffin. The glass plate is affixed with adhesive tape. The paper is supported by 30 glass needles, vertically inserted in small pieces of cork and regularly spaced.

The solvent, 35 ml, is placed in a flat-bottomed dish, 2.5 cm high and 5 cm wide. A glass tube, provided with a groove at the lower end, serves as an additional support for the paper and as a leader for the paper tongue, which has a width of 1 cm. The latter is inserted into a razor slit at a distance of 5 cm from the periphery of the paper. The amino acid mixture is applied on both segments at a distance of 1 cm from the paper tongue. After the spots have been allowed to dry, the chromatogram is run till the solvent front reaches the end of the slits at the right and left side. At a temperature of 18–20° this usually takes 22–30 h. The paper is allowed to dry, one segment is developed with ninhydrin, the corresponding zones on the other segment are marked with a compass and cut out for capillary elution.

Capillary elution and subseparation of groups

This is nearly identical to the method of GIRI AND RAO[10], except that the leaderstrip and the cut out group band are placed between two microscope slides, which are held together with paper clips (Fig. 5). This modification reduces the time required for the

References p. 326.

elution process and can be accomplished in 30 instead of 90 min. Leaderstrip and cut out group band should be of equal width.

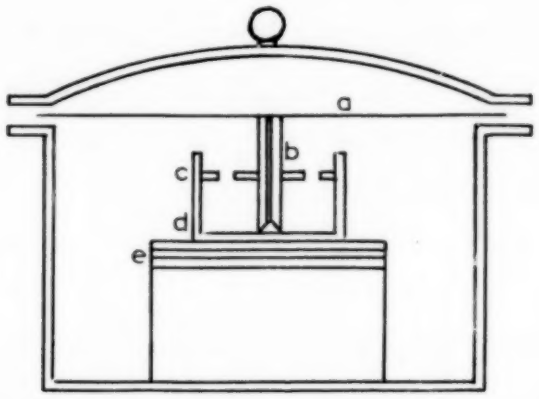


Fig. 3. Chromatography with K.C.T.-paper. a, K.C.T.-paper; b, capillary; c, perforated glass plate, resting on pieces of glass tube not shown in sketch; d, solvent vessel; e, glass plates for height adjustment.

The eluting technique is critical, an excess of water may flood the paper. Two ml in the upper vessel of Fig. 5 usually gave a suitable speed which, if necessary, can be increased by dropwise addition of water from a pipette. The K.C.T.-paper should be in contact with the lower tip of the cut out zone. When the eluted spot has extended

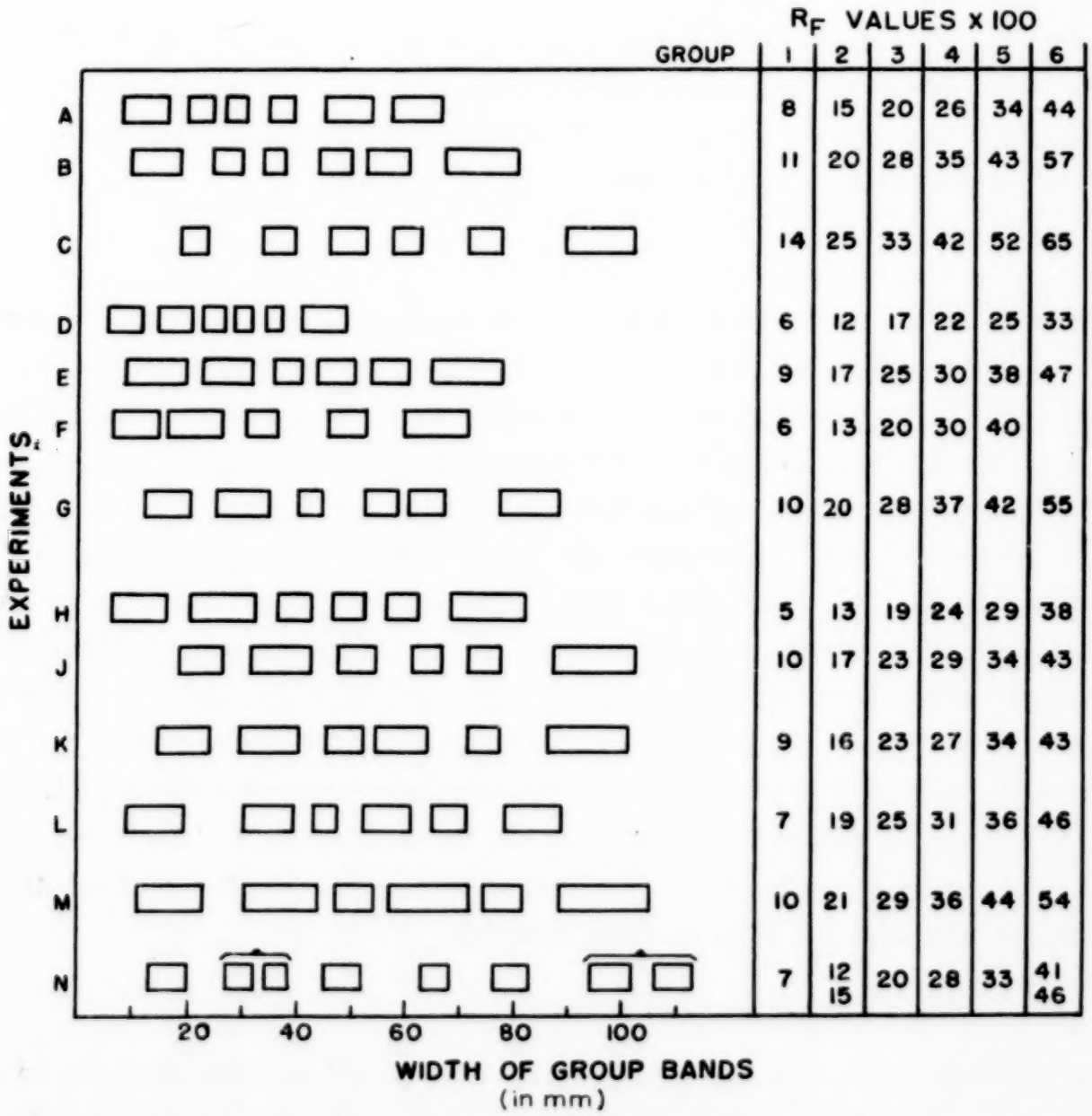


Fig. 4. Spacing, width and R_F values of six groups of amino acids, obtained under various conditions with the solvent *n*-butanol–butanone–ammonia–water. See also Table I.

References p. 326.

to 4 mm diameter, the K.C.T.-paper is detached by a turn of the screw (Fig. 5), dried at 3 cm distance from a hot plate for 30 sec and replaced. Fifteen to twenty repetitions are usually adequate, as proved by ninhydrin tests with the eluted paper, twenty-five can be made for good measure. Zone 1, 3 and 6 are transferred to different segments of one K.C.T. paper, which is chromatographed with *tert.*-butanol–formic acid–water and zone 2 and 4 are eluted on different segments of another paper which is chromatographed with lutidine–water.

The separation of the groups into individual amino acids is carried out in desiccators of 28 cm width (Fig. 3). The solvent reaches the paper through a capillary, 3 by 0.6

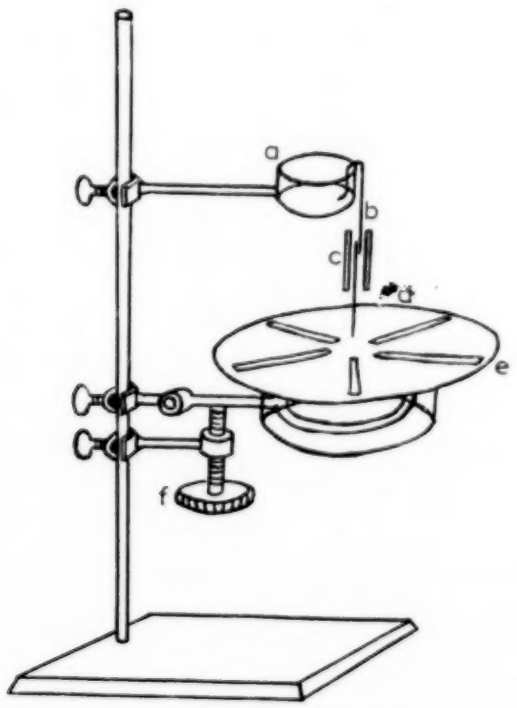


Fig. 5. Chromatography with K.C.T.-paper and capillary elution. a, solvent vessel; b, leaderstrip; c, microscope slides; d, cut out band from first chromatogram; e, K.C.T.-paper.

cm with a 0.36 mm bore. The capillary has a groove at its lower end, permitting access of the solvent and is held in vertical position by a perforated glass plate, which rests on 3 small pieces of glass tube or small weighing glasses. The glass vessels for the developing solvents are identical to those used in the wooden cabinet and contain 35 ml of liquid. In the case of *tert.*-butanol–formic acid–water, 130 ml of solvent are placed in a large petri dish at the bottom of the desiccator. This increases the speed of this slow-moving solvent system. For lutidine–water the addition of 20 ml was adequate to saturate the atmosphere.

The R_F values obtained by this method differ sufficiently for cutting out and eluting the ninhydrin compounds of the various amino acids, especially as the bands are only 3 to 5 mm wide when the two solvents mentioned above are used with 133 μg hydrolysate (Table II). As observed by other authors, the R_F values vary to a certain extent, but the intervals between them are practically constant. Groups 2 and 6 show each a tendency to split up into two bands. As regards group 2 no useful purpose would be served by cutting its bands out and eluting them separately, because lutidine–water separates all four amino acids of this group adequately (Table II). In group 6 isoleucine may be separated from the last group, containing leucine and

References p. 326.

TABLE II

SEPARATION OF A PROTEIN HYDROLYSATE INTO SIX GROUPS AND SUBSEPARATION OF THESE INTO INDIVIDUAL AMINO ACIDS ($R_F \times 100$)

Group	*Amino acids*	*n-BuOH–methyl ethyl ketone–water–ammonia, 17 N (5:3:1:1), after 2 runs*	*tert.-BuOH–HCOOH–H_2O (75:0.8:24.2)*	*Lutidine-water (2:1)*
1	Cysteine		26*	
	Glutamic acid	7	39	
	Aspartic acid		48	
2	Lysine	12		17
	Arginine			25
	Glycine	15		39
	Hydroxyproline			—
3	Histidine		76	
	Alanine	20	50	
	Serine		38	
4	Tyrosine			65
	Valine	28		44
	Methionine			51
	Proline			—
5	Threonine	33	37	
6	Isoleucine–leucine	41	63	
	Phenylalanine	46	53	

* The eluted spot was treated with a spot of H_2O_2. Non observance of this will produce from reagent cystine one more band at R_F 16. Proline[22], hydroxyproline[23] and trytophan[24] were determined by specific tests.

phenylalanine, but since the two leucine isomers are usually reported together, this subseparation is not absolutely necessary. If the removal of acid from the hydrolysate is inadequate, as may happen in case only one vacuum destillation has been applied, some threonine may be found in the 6th group.

After the completion of each run, the chromatograms are put in a ventilated fume hood till the translucency of the paper disappears, which usually takes five minutes. They are then washed twice with chloroform, dried at 60° and developed with ninhydrin according to the technique of KAY and co-workers[18]. Omitting the chloroform treatment of chromatograms run with lutidine may give low values, especially for glycine and methionine.

The effect of temperature variations

The temperature of our laboratory usually fluctuates between 19 and 22°, which did not affect the results described here. Higher fluctuations (15–22°), which occurred occasionally on account of breakdowns of the electric supply, interfered strongly. As a precaution the chromatographic chambers and desiccators may be placed inside a cabinet.

DISCUSSION

The fact that difficulties have been experienced in duplicating the results of other workers in the field does not in our opinion justify the statement of PROOM AND WOIWOD[19] who regard circular paper chromatography as "admirable for the separation of two or three substances, (but) not a satisfactory substitute for large scale

References p. 326.

paper chromatography in the separation of----protein hydrolysates". Although we felt it necessary to modify some details of the technique proposed by GIRI, we fully agree with this author's conclusion[20]: "The method is well suited to the separation, identification and even quantitative estimation of----amino acids----".

Reduced laboratory space, controlled solvent flow, small amounts of solvents, sharp bands, the facts that the centre of gravity of each zone is clearly defined[3] and that reference samples can be applied to the same sheet of paper as the test sample are advantages, which outweigh the additional step of capillary elution. It is true that a certain amount of crowding occurs, since no solvent system has as yet been found which spaces 18 amino acids evenly. Therefore it is in the opinion of the authors more important to have a small number of widely spaced groups in the first chromatogram than to have a greater number of crowded ones, provided the eluted groups can be easily separated into their individual amino acids. For the latter purpose the pyridine-containing solvent systems of GIRI did not always give ideal results on K.C.T. paper, probably because its radius is smaller than that used by GIRI. The combination of solvent systems described in this paper permits adequate separations. The fact that PROOM AND WOIWOD could not confirm GIRI's results may have also been caused by different amounts of solvents used. The latter author mentions only a "provision, where necessary for irrigation after the atmosphere was completely saturated----by attaching a glass tube with stopcock at the side of the basin"[5]. The amounts of solvents in relation to the volume of the cabinets used in both laboratories would be of interest, because our experiments G, K, L and M show that increased amounts of solvents widen the bands.

Occasionally the egg shape formation, resulting in distorted bands, made itself adversely felt with the K.C.T. paper. A typical case is shown in Fig. 2b with respect to group 4. One can of course draw conclusions as regards identity from the R_F values, but if a similar paper could be manufactured with an even number of slits, for instance four, arranged in positions vertical and parallel to the calendering of the paper, this interference would be less disturbing, because test sample and standard sample could be spotted opposite each other, so that the location of each spot of a band would correspond to that of its antipode.

Since the length of the run appears to be one of the most important factors, the triangular technique has been tried also with the solvent system *n*-butanol–acetic acid–water (4:1:5). Ten groups are obtained after two runs, but the intervals between five of them are only 3 mm wide. This solvent system may nevertheless be suitable for proteinaceous substances, containing a limited number of amino acids only. The distribution of amino acids is under investigation and will be reported separately.

SUMMARY

Various modifications of the circular paper chromatographic method for the quantitative determination of amino acids in protein hydrolysates have been investigated. With the system *n*-butanol–2-butanone–water–ammonia (5:3:1:1) six groups are obtained. Two groups are separated into their individual components with the system lutidine–water, three others with *tert.*-butanol–formic acid–water (75:0.8:24.2). Threonine appears as a single band. Length of the run is increased and separation is improved by dividing the paper into triangular segments and by putting the starting point near the periphery.

References p. 326.

REFERENCES

1 L. RUTTER, *Analyst*, 75 (1950) 37.
2 L. RUTTER, *Nature*, 161 (1948) 435.
3 R. J. LESTRANGE AND R. H. MÜLLER, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 953.
4 A. SAIFER AND J. ORESKES, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 1539.
5 K. V. GIRI AND N. A. N. RAO, *J. Indian Inst. Sci.*, 34 (1952) 95.
6 A. J. P. MARTIN, *Endeavour*, 6 (1947) 21, reproduced in R. J. BLOCK, R. LESTRANGE AND G. ZWEIG, *Paper Chromatography*, Academic Press, Inc., New York, 1952, p. 54.
7 O. LUDERITZ AND O. WESTPHAL, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 136.
8 K. V. GIRI, K. KRISHNAMURTHY AND T. A. VENKATASUBRAMANIAN, *J. Indian Inst. Sci.*, 34 (1952) 209, Plate VIII.
9 E. KAWERAU, *Chromatog. Methods*, 1, No. 2 (1956) 7.
10 K. V. GIRI AND N. A. N. RAO, *J. Indian Inst. Sci.*, 35 (1953) 343.
11 K. KRISHNAMURTHY AND M. SWAMINATHAN, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 1396.
12 N. A. N. RAO AND T. K. WADHWANI, *J. Indian Inst. Sci.*, 37A (1955) 130.
13 N. A. N. RAO AND T. K. WADHWANI, *Current Sci. (India)*, 23 (1954) 359.
14 K. V. GIRI, *Nature*, 171 (1953) 1159.
15 P. H. MARR, *Pharm. Weekblad*, 88 (1953) 319.
16 O. J. DRAPER AND A. L. POLLARD, *Science*, 109 (1949) 448.
17 M. WOLFE, *Biochim. Biophys. Acta*, 23 (1957) 186.
18 R. E. KAY, D. C. HARRIS AND C. ENTENMANN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 63 (1956) 14.
19 H. PROOM AND A. J. WOIWOD, *Nature*, 171 (1953) 42.
20 K. V. GIRI, *Nature*, 171 (1953) 1159.
21 Personal information from Mr. S. CHARI, Madras.
22 W. TROLL AND J. LINDSLEY, *J. Biol. Chem.*, 215 (1955) 655.
23 R. E. NEUMANN AND M. L. LOGAN, *J. Biol. Chem.*, 184 (1950) 299.
24 R. J. BLOCK AND D. BOLLING, *The Amino Acid Composition of Proteins and Foods*, Charles C. Thomas, Springfield, Ill., 1951, p. 122 (Voisenet-Rhode reaction).

Received January 20th, 1958

SEPARATION AND IDENTIFICATION OF MAJOR ALKALOIDS FROM OPIUM BY PARTITION CHROMATOGRAPHY ON PAPER*

GUY NADEAU, GEORGE SOBOLEWSKI, LORRAINE FISET

Biochemistry Department, Hôpital Saint-Michel Archange, Quebec (Canada)

AND

CHARLES G. FARMILO

Organic Chemistry Section, Food and Drug Directorate, Department of National Health and Welfare, Ottawa (Canada)

Several investigators[1,2,4–8,12–19,21] have used paper chromatography as a means of separating and identifying alkaloids derived from opium. Most methods which have been published, however, utilized pure solutions of alkaloids and are not necessarily applicable to the crude extracts of raw opium, although ASAHINA AND ONO[1] have determined morphine and codeine individually in the natural product.

Both the descending and ascending methods of paper partition chromatography have been studied, but, according to GORE[5], the latter technique may be preferable since it is easier and requires no special apparatus. It has been found that, in general, alkaloids are more sharply resolved on acid buffered paper[16,19]. MUNIER[16] claims that this treatment allows the use of neutral solvents in many instances, and may eliminate most of the trailing and elongation of spots. Increasing acidity will also increase the range of distribution of alkaloids, the optimum being between pH 4.0 and 5.0 for opium alkaloids and their derivatives[12,19].

It appears that the choice developing solvents for alkaloids are the higher alcohols of the aliphatic series (*n*-butanol, isobutanol, amyl alcohols), although other solvents have been used advantageously. For instance, LUSSMAN *et al.*[11] employed cyclohexanol for the separation of cinchona alkaloids. The higher alcohols are usually saturated by shaking or refluxing with water or aqueous solutions of acids (mineral or organic) until equilibrium is reached between both phases. This may require many hours. The water-immiscible solvent is then used for chromatographic development.

Neutral solvents usually show poor resolution[5] unless acid-buffered papers are used[16]. Alkaloids of the opium group and their synthetic derivatives tend to separate more sharply in acidified solvents[18,25], although an excessive concentration of acid in the solvent phase may lead to poor resolution. Under these conditions, the alkaloids have a tendency to follow the solvent front[16]. MUNIER[17] has separated many alkaloids by varying the concentration of acid in the solvent phase, in presence of a minimum of water. Water is added dropwise with constant agitation to a given mixture of organic solvent (say, *n*-butanol, 100 parts) and of acid (acetic acid, 20 parts) until a slight turbidity persists for a while. The solvent may be known as *n*-butanol–acetic acid 5:1. According to the author, the amount of water added need not be indicated since it is exactly that required to saturate the organic solvent and may be duplicated accurately in subsequent preparations. Other advantages of this procedure are that the solvent may be used at once and that the concentration of acid in the solvent phase may be exactly ascertained.

Water-miscible systems (ethanol, propanol, acetone) have also been investigated, but with little success for opium alkaloids[5,6,18]. RESPLANDY[20] claims that some alkaloids can be separated by development with electrolyte solutions. He found that salts of monovalent cations have a retarding action on the motion of the spots, ammonium ion showing the most marked effect. Among the anions, sulfate appears to be most suitable for this purpose.

Most of the methods using water-immiscible solvents also involve development in an atmosphere saturated either with the solvent phase, an aqueous phase, or both, to insure equilibrium of the system. Various types of air-tight containers have been described for this purpose and some are commercially available. In such systems, it is commonly assumed that the observed separations are a result of continuous partitions between the aqueous stationary phase and the water-im-

* This work was supported under the Mental Health Grants Programme of the Department of National Health and Welfare, Canada.

References p. 337.

miscible mobile phase. This hypothesis evidently does not hold in chromatographic development with water-miscible solvents or aqueous solutions in which only one phase exists[9].

Identification of the individual spots has been effected determining their R_F value (position relative to the solvent front). Reproducibility of R_F values is the crucial aspect of most methods and appears to be most difficult to obtain. They have been found to vary, not only with temperature, with variations of solvent composition and of pH, with the size of the chamber used for development[3], but also with the method of measurement of R_F, which raises the question of locating the real geometric or densitometric center of the spot. Because of these variables, a reference substance is usually run simultaneously with the unknown samples. Some workers have substituted for the R_F value, the ratio of the distance traveled by the individual spots to that of a reference substance. GOLDBAUM AND KAZYAK[4] have used codeine for this purpose. This ratio is considered to be more reproducible than R_F values.

In the actual problem of separating the major alkaloids of opium, the methods previously referred to are more or less satisfactory. More than one system appears to be needed. Under various conditions (propanol–water with KH_2PO_4-treated paper, *n*-butanol–HCl with KCl-treated paper or *n*-butanol–acetic acid with CH_3COONa-treated paper), MUNIER[18] succeeded in resolving from mixtures of pure products, morphine, codeine and thebaine, but not narcotine from papaverine. MANNERING[12] also failed to separate mixtures of pure narcotine and papaverine, either with isoamyl alcohol–acetic acid, isoamyl alcohol–ammonia or *n*-butanol–acetic acid systems on paper buffered with phosphates. Moreover, the last system could not separate codeine from thebaine. Other workers[7,13] encountered the same difficulty when using the butanols as solvents. BELLES *et al.*[2] did not include narcotine in an otherwise extensive survey of alkaloids separated by descending paper chromatography. A more recent method by SCHMALL, WOLLISH AND SHAFER[21] using multibuffered paper, does not resolve narcotine from papaverine. The authors state that compounds having the same pK value cannot be separated by their technique.

In all the preceding papers, there is no mention of any attempt to apply the technique to actual opium extracts, although MUNIER[18] claims that preliminary extractions and purifications of vegetal samples would be necessary in order to eliminate pigments, salts and lipids.

The object of the present study was to develop a single procedure which would allow the actual separation of the major opium alkaloids directly from the natural product.

EXPERIMENTAL

I. Preliminary investigation

General procedure

All experiments were performed with the ascending technique, on rectangular sheets of paper fastened into cylinders with staples. Glass jars (or conventional aquariums) covered with a heavy glass plate were used as chambers. The samples were applied in the smallest area feasible and dried with a current of hot air. After development, the sheets were removed, opened flat and dried under the hood with the aid of an electric fan. They were examined first under ultraviolet light. Solvent front and fluorescent zones were noted. The sheets were then sprayed as evenly as possible with potassium iodoplatinate reagent according to MUNIER[18] and dried with a current of air.

Pure alkaloids

The pure alkaloids were used either as free bases or hydrochlorides and sulfates (dissolved in 95% ethanol). The reference solution was made by dissolving 0.50 g of morphine, 0.06 g of codeine, 0.04 g of thebaine, 0.325 g of narcotine and 0.05 g of papaverine, to 100 ml with 95% ethanol, to approximate the proportions encountered in the natural product.

Papers

Whatman No. 1 or 3MM and Schleicher and Schuell No. 576 were found satisfactory. Development with Whatman No. 4, a less retentive paper, was more rapid, but the spots had a tendency to be somewhat more diffuse.

Pretreatment of paper

The papers were used either as such or were treated with various salts and buffers. These included a wide range of concentrations of chlorides, sulfates, phosphates and acetates of monovalent cations (potassium, sodium and ammonium). Phosphate–citrate, acid phosphate and barbiturate buffers were also investigated.

The most satisfactory procedure for the treatment of paper is described in Part II.

Mobile solvents

Both *n*- and isobutanol solvents were found satisfactory. With the latter, however, it was easier to detect the individual alkaloids present in opium extracts. Amyl alcohols yielded poor results in all the systems investigated. Cyclohexanol was found to behave somewhat like the butanols.

References p. 337.

However, no advantage was found in its use, since it failed to separate narcotine from papaverine. Investigation of other solvents was directed towards the separation of these alkaloids especially and is discussed below.

Acidification of the solvents with acids other than acetic, such as formic, and hydrochloric, was abandoned after various trials. With the latter particularly, there was often formation of more than one liquid front, a phenomenon known as "demixion"[9,18].

TABLE I

R_F VALUES AND CODEINE RATIOS OF ALKALOIDS

Developed with isobutanol–acetic acid 5:1 solvent and 2% $(NH_4)_2SO_4$-treated paper.

	Mixture of pure alkaloids	*Opium extracts*
	R_F value	
Morphine	0.27–0.30 (0.29)*	0.29–0.30 (0.29)
Codeine	0.40–0.45 (0.43)	0.45–0.54 (0.49)
Cotarnine	0.58–0.68 (0.62)	— —
Thebaine	0.76–0.84 (0.79_5)	0.75–0.83 (0.78)
Narc. Papav.	0.87–0.93 (0.89)	0.84–0.91 (0.87_5)
	Codeine ratio	
Morphine	0.66–0.70 (0.68)	0.56–0.65 (0.60)
Codeine	— (1.00)	— (1.00)
Cotarnine	1.37–1.51 (1.44)	— —
Thebaine	1.81–1.90 (1.86)	1.54–1.76 (1.60)
Narc. Papav.	2.04–2.18 (2.09)	1.69–2.00 (1.79_5)

* Average values in parentheses.

TABLE II

R_F VALUES AND CODEINE RATIOS OF ALKALOIDS

Developed with water-saturated *n*- or isobutanol in identical conditions.

	2% $(NH_4)_2SO_4$-treated paper		*M/2 KH_2PO_4-treated paper*	
	Water-satd. n-butanol	*Isobutanol*	*Water-satd. n-butanol*	*Isobutanol*
	R_F value			
Morphine	0.15–0.20 (0.18)*	0.13–0.14 (0.14)	0.21–0.24 (0.22)	0.15–0.17 (0.16)
Codeine	0.23–0.29 (0.26)	0.20–0.22 (0.21)	0.28–0.31 (0.30)	0.21–0.25 (0.23)
Cotarnine	0.32–0.39 (0.36)	0.29–0.32 (0.30_5)	0.35–0.38 (0.37)	0.27–0.32 (0.30)
Thebaine	0.56–0.66 (0.61)	0.53–0.60 (0.56_5)	0.56–0.68 (0.62)	0.53–0.61 (0.58)
Narc. Papav.	0.85–0.91 (0.87)	0.91–0.93 (0.92)	0.81–0.92_5 (0.88)	0.93–0.95 (0.94)
	Codeine ratio			
Morphine	0.65–0.73 (0.69)	0.64–0.65 (0.64_5)	0.73–0.77 (0.75)	0.67–0.71 (0.69)
Codeine	— — (1.00)	— — (1.00)	— — (1.00)	— — (1.00)
Cotarnine	1.34–1.39 (1.37)	1.45 — (1.45)	1.23–1.25 (1.24)	1.28–1.29 (1.28)
Thebaine	2.28–2.44 (2.34)	2.65–2.72 (2.68_5)	2.00–2.19 (2.07)	2.44–2.52 (2.47)
Narc. Papav.	2.96–3.96 (3.40)	4.14–4.65 (4.29_5)	2.89–3.08 (2.96)	3.78–4.43 (4.06)

* Average values in parentheses.

The following systems, in order of importance, gave the best results (wide distribution and sharpness of spots):

(a) isobutanol–acetic acid 5:1, paper treated with 2% ammonium sulfate,

(b) *n*-butanol–acetic acid 5:1, paper treated with 2% ammonium sulfate, and

(c) *n*-butanol–acetic acid 5:1, paper treated with *M*/2 KH_2PO_4.

Freshly prepared solvents were used throughout the study to avoid formation of increased amounts of butyl esters.

References p. 337.

Aqueous saturation of paper and chamber humidity

Exact control of the degree of humidity of the paper during development was one crucial aspect of the methods investigated. Failure to respect this usually ended in poor resolution, often in trailing of the spots. In some cases, the alkaloids, especially those with high R_F values, had a tendency to follow the solvent front. It was also found that, with proper humidity, the rise of the organic phase was more uniform.

Several means of controlling chamber humidity were investigated. Solvent-saturated water or solvent-saturated acid solutions gave equally poor results with isobutanol, although the former was satisfactory for *n*-butanol. Again best conditions of chamber equilibrium are described in Part II.

Identification of alkaloids

Cotarnine, papaverine and narcotine are easily detected by their fluorescence under ultraviolet light. It must be kept in mind, however, that the presence of salts may quench the fluorescence to a high degree and interfere with quantitative estimations by fluorimetry. When they are mixed together, the fluorescence of narcotine is masked by that of papaverine.

Detection of the spots can also be effected by spraying the paper or immersing it into staining solutions. The following reagents were investigated: iodine–iodide[12,18], Dragendorff's reagent[12], thallium–iodine[12,18], bromphenol blue[10], ceric sulfate[22] and potassium iodoplatinate. The latter, developed by MUNIER[18], was found the most convenient indicator reagent in the present study. It has the advantages of giving various colorations with different alkaloids and of being highly sensitive. MANNERING[12] claims that it can detect 2 μg of morphine, codeine or thebaine, 3 μg of papaverine and 5 μg of narcotine, figures in accord with those obtained in the present investigation.

R_F values and alkaloid ratios

Height reached by the solvent front, in a given time, was found to vary with the size of the chamber. This affected R_F values. Uncontrolled variations of pH of buffered paper also altered R_F values. Slight variations of temperature (18–23°) had a less marked effect. In general, R_F values calculated from the densitometric center of the spots, rather than from the geometric center, were more reproducible. This aspect of the problem suggests further investigation. Although attempts to substitute alkaloid ratios for R_F values were somewhat more successful (Tables I and II), it was found more convenient, in the last resort, to run a reference solution of mixed alkaloids along with the unknown samples.

II. Chromatography of opium

1. *Preparation of extract*

Samples weighing 0.5 g were thoroughly ground with 5 ml of a water–glacial acetic acid mixture 1:1 and centrifuged. The supernatant liquid was used directly for chromatographic development.

2. *Buffered paper*

Whatman No. 1 paper (28 cm wide, 32 cm high) was satisfactory. The sheets were immersed in a 2% solution of ammonium sulfate (or $M/2$ potassium dihydrogen phosphate) in water. The excess of liquid was removed first by draining then by sponging the sheets lightly between layers of towel paper. The sheets were allowed to dry vertically, at room temperature, with the aid of a fan.

3. *Developing solvent*

A mixture of 100 parts of isobutanol (reagent grade) and 20 parts of glacial acetic acid was saturated by adding water dropwise (about 36–40 parts) with constant agitation (electric or magnetic stirrer) until turbidity persisted for not more than 45–60 seconds. A volume of 50 ml of freshly prepared solvent was required for each sheet to be

References p. 337.

chromatographed. The solvent was recuperated and used in subsequent experiments for saturating the chamber atmosphere before and during development.

4. *Chromatographic procedure*

After the samples had been applied, the sheets were left for at least one hour to reach phase equilibrium. For this purpose, two sheets of filter paper, fashioned in the same

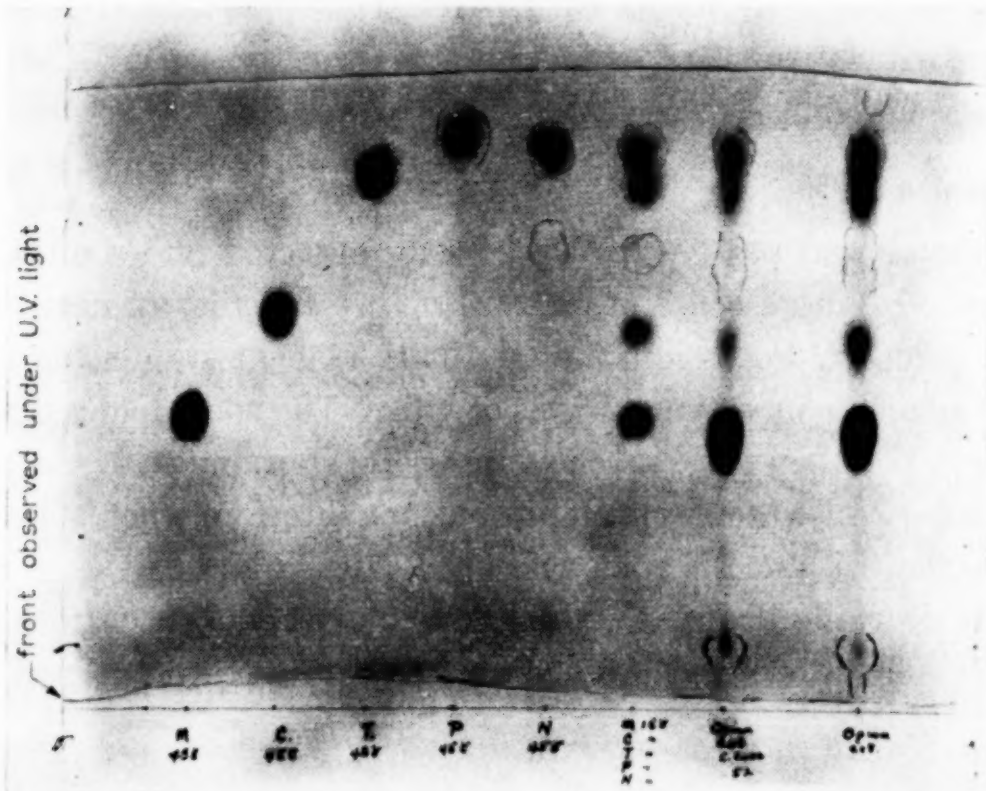


Fig. 1. Chromatogram of pure samples of alkaloids (individually and collectively), along with two opium extracts (after K iodoplatinate spray).

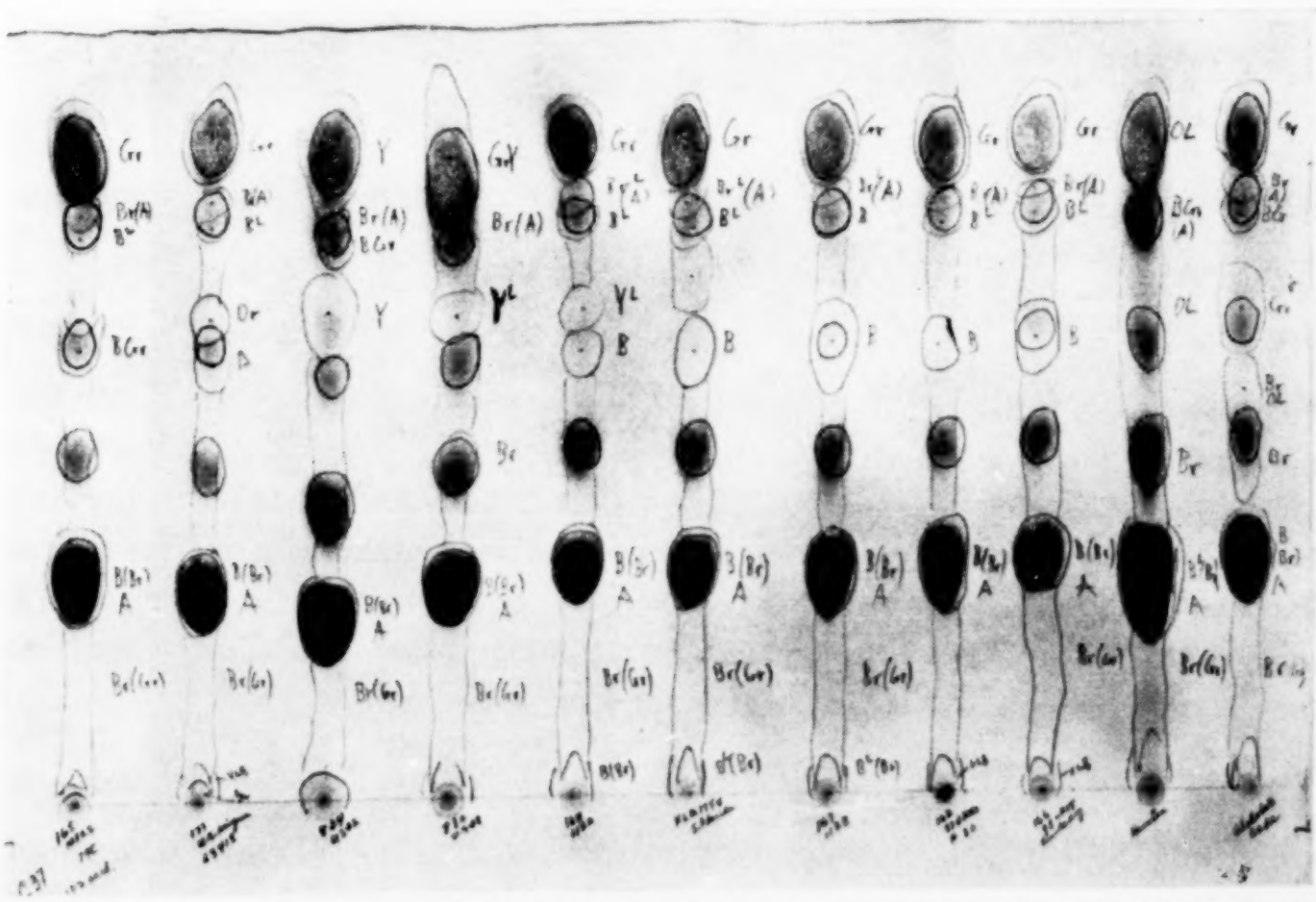


Fig. 2. Chromatogram of opium samples from various sources (origin) after K iodoplatinate spray. The fluorescent zones have been circled.

References p. 337.

manner, were wetted and placed, one in a dish containing water and the other in a dish containing recuperated solvent. These sheets were left in the chamber during development. This procedure allowed rapid saturation of atmosphere.

The sheets were then lifted and 50 ml of solvent were poured into the dish. The solvent was allowed to rise to a definite level near the upper edge regardless of the time required to reach it. This precaution was not necessary when the reference solution was run simultaneously on each sheet. This step took from 16 to 17 hours depending upon temperature (18°–23°) and size of chamber. With Whatman No. 4 paper, the time was reduced to 6–7 hours.

Results and comments

Cotarnine, narcotine and papaverine were easily detected under ultraviolet light in the present method. Fluorescence of papaverine masked that of narcotine, when the alkaloids were together. Potassium iodoplatinate reagent stained morphine in deep blue, the other alkaloids in various shades of violet. The spots had a tendency to fade on long standing, but they were revealed again by spraying with the reagent. Trace alkaloids and other constituents of opium did not interfere when solutions obtained by direct extraction with acetic acid were used (Figs. 1 and 2).

Elongation or trailing appeared unavoidable when concentrations were high (Fig. 1). Occasionally the solvent failed to reach the expected level. Under these

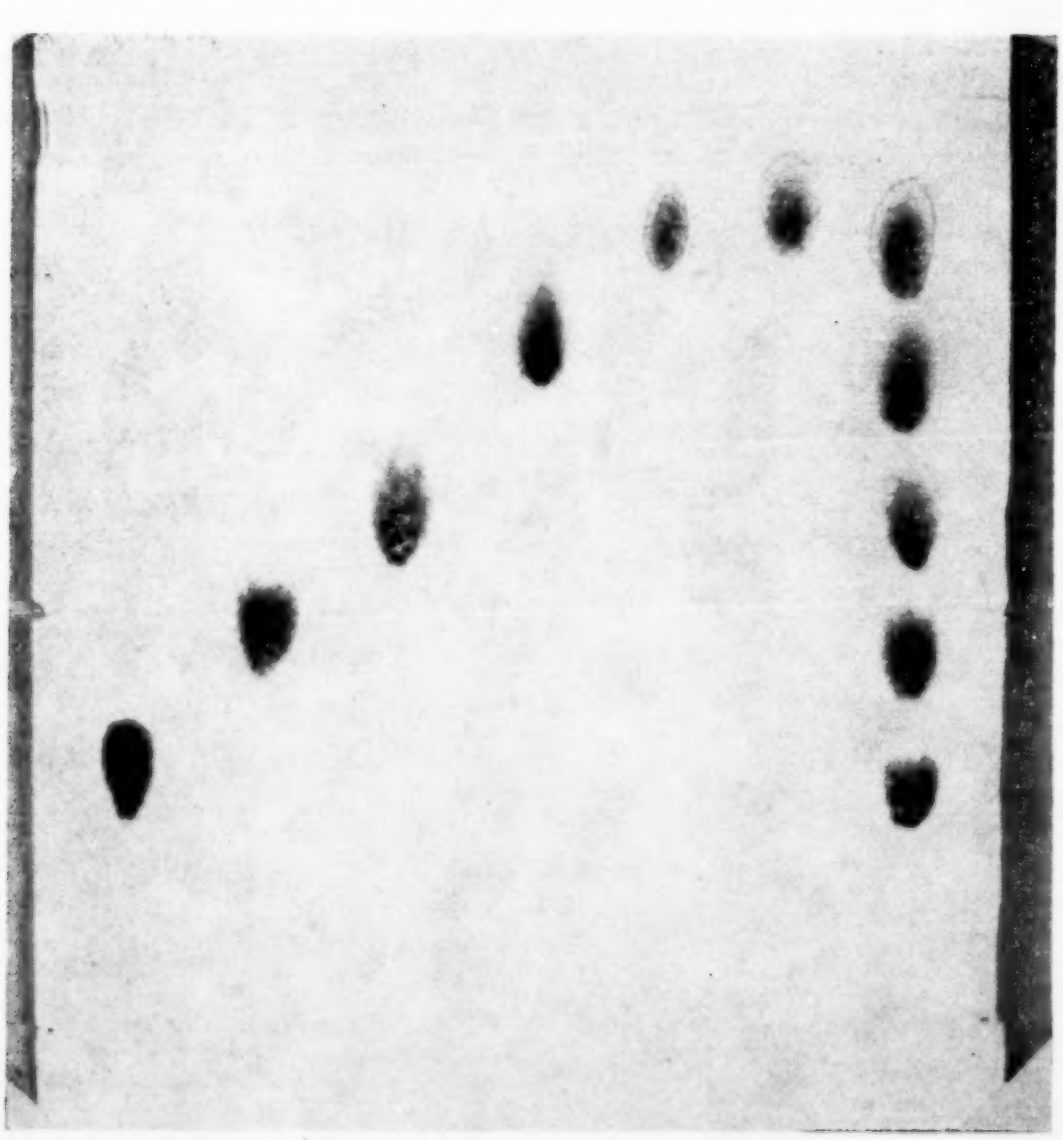


Fig. 3. Chromatogram of (from left to right) morphine, codeine, cotarnine, thebaine, narcotine and papaverine and a mixture of the five alkaloids.

References p. 337.

circumstances, it was observed that the alkaloids with high R_F values had coalesced just below the solvent front forming spots with a flattened appearance. Some alteration in the equilibrium between solvent and aqueous phase during development appears to be involved. For instance, this difficulty arose with certain batches of paper (differences in water adsorption?) and also when an excess of water had been added during the preparation of the solvent.

No differences in R_F values were noted between bases or salts (hydrochlorides, sulfates or acetates in case of extracts). The alkaloids were distributed in the following order of increasing R_F value: morphine, codeine, cotarnine, thebaine and finally narcotine along with papaverine (Tables I and II and Fig. 3).

III. Separation of narcotine and papaverine

None of the solvents which have been described in this communication for the separation of the major opium alkaloids are effective in separating narcotine from papaverine.

In a recent publication, KROGERUS[7] reports that the use of acidified dioxan or acidified ether as mobile solvents will result in the separation of narcotine from papaverine on untreated Whatman No. 1 paper. Repeated trials with various lots of dioxan have failed in this laboratory to yield the results obtained by the author. However, the ether solvent has been applied successfully to two-dimensional chromatography in order to achieve the separation of these two alkaloids following their separation from the other major alkaloids. In the first solvent, morphine, codeine and thebaine were separated from narcotine and papaverine. The paper was dried, rotated at a 90° angle and then inserted into the second solvent, ether saturated with aqueous phase, in which the desired separation of narcotine from papaverine is obtained.

Materials

The equipment and materials employed was the same as those previously described (Part II).

Preparation of ether solvents

The solvent suggested by KROGERUS[7] was used. This was prepared by shaking 100 ml of ethyl ether with 40 ml of 0.1 *M* acetic acid. The aqueous phase was used to saturate the atmosphere of the developing chamber while the organic phase was employed as the mobile solvent. Two other solvents were prepared by substituting for the 40 ml of 0.1 *M* acetic acid, the same volume of water or of 0.2 *M* acetic acid. The results obtained with the last, however, were not significantly different from those obtained with 0.1 *M* acetic acid and therefore are not considered in this report.

Presaturation of papers

If the chromatograms, after treatment with the first solvent, were placed immediately in the ether solvent without a presaturation period, some narcotine and/or papaverine could always be detected at that spot where they had been deposited by the first

References p. 337.

solvent. This difficulty was obviated by allowing a three hour presaturation period in the presence of aqueous phase before the addition of the mobile solvent. When narcotine and papaverine were spotted on fresh, untreated Whatman No. 1 paper or on paper pretreated with salt, however, quantitative removal of the alkaloids from the baseline was never obtained despite the long presaturation period.

Procedure

For two-dimensional chromatography, the material under study was spotted at two points, each located about 2.5 cm from the bottom and 2.5 cm from either edge of an appropriately treated sheet of Whatman No. 1 paper (28 cm × 32 cm).

Development in the first solvent was permitted to take place according to the method previously outlined. After its removal from this solvent, the sheet was dried and examined under ultraviolet light so that the solvent front and fluorescent zones (particularly due to narcotine and papaverine) might be noted. A strip, 4.5 cm wide, was then cut off the right hand side of the sheet. This strip was sprayed with the indicator reagent in order to determine the number of components separated by the solvent.

The other unstained portion of the sheet was now rotated at a 90° angle, rolled into a cylinder and its edges stapled. The paper was placed in the chamber which also contained a second paper cylinder soaked with aqueous phase and left to saturate in this atmosphere for 3 hours. After this time, 90 ml of ether saturated with aqueous phase (water or 0.1 *M* acetic acid) were used for development. The ascent of the solvent to within 1–2 cm of the top edge of the cylinder was usually effected in about 2 hours. The sheet was then removed, dried, examined under ultraviolet light and stained.

Results

Several combinations of salt-treated papers and mobile organic solvents were shown in a previous section to give clear-cut separations of morphine, codeine and thebaine from one another and from narcotine and papaverine. The best combinations were

TABLE III

THE EFFECT OF TWO ETHER SOLVENTS ON THE SEPARATION OF NARCOTINE AND PAPAVERINE IN TWO-DIMENSIONAL CHROMATOGRAPHY

	Pretreatment	*First solvent*	*Second solvent*	*Results*
1	*M*/2 KH_2PO_4	H_2O-satd. *n*-butanol	Acid*-satd. ether	Separations of narcotine and papaverine are always obtained but there is a tendency for the spots to be diffuse and irregular in appearance
2	*M*/2 KH_2PO_4	H_2O-satd. *n*-butanol	H_2O-satd. ether	
3	2% $(NH_4)_2SO_4$	H_2O-satd. *n*-butanol	Acid*-satd. ether	
4	2% $(NH_4)_2SO_4$	H_2O-satd. *n*-butanol	H_2O-satd. ether	
5	2% $(NH_4)_2SO_4$	Isobutanol–acetic acid 5:1	Acid*-satd. ether	
6	2% $(NH_4)_2SO_4$	Isobutanol–acetic acid 5:1	H_2O-satd. ether	Narcotine and papaverine separate. Best conditions insofar as the final appearance of the spots is concerned

* 0.1 *M* acetic acid

References p. 337.

selected in an attempt to determine with which one(s) could be obtained the most satisfactory separation of narcotine and papaverine in a second solvent. Both water-saturated ether and ether saturated with 0.1 *M* acetic acid were tried as second solvents. The results of these experiments are summarized in Table III. It will be noted that narcotine and papaverine were always separated by either of the ether solvents used. The position of the other alkaloids was not disturbed by the run in the second solvent under the conditions listed in 1, 3, 4 and 5 (Table III), but thebaine migrated a short distance under the conditions listed in 2 and codeine and thebaine under the conditions in 6. This, however, had no effect on the final interpretation of the results. In fact, insofar as the chromatography of opium extracts is concerned, the displacement of codeine and thebaine in the second solvent provides a convenient check in cases where their presence in low concentrations may have rendered uncertain their identification after separation in the first solvent.

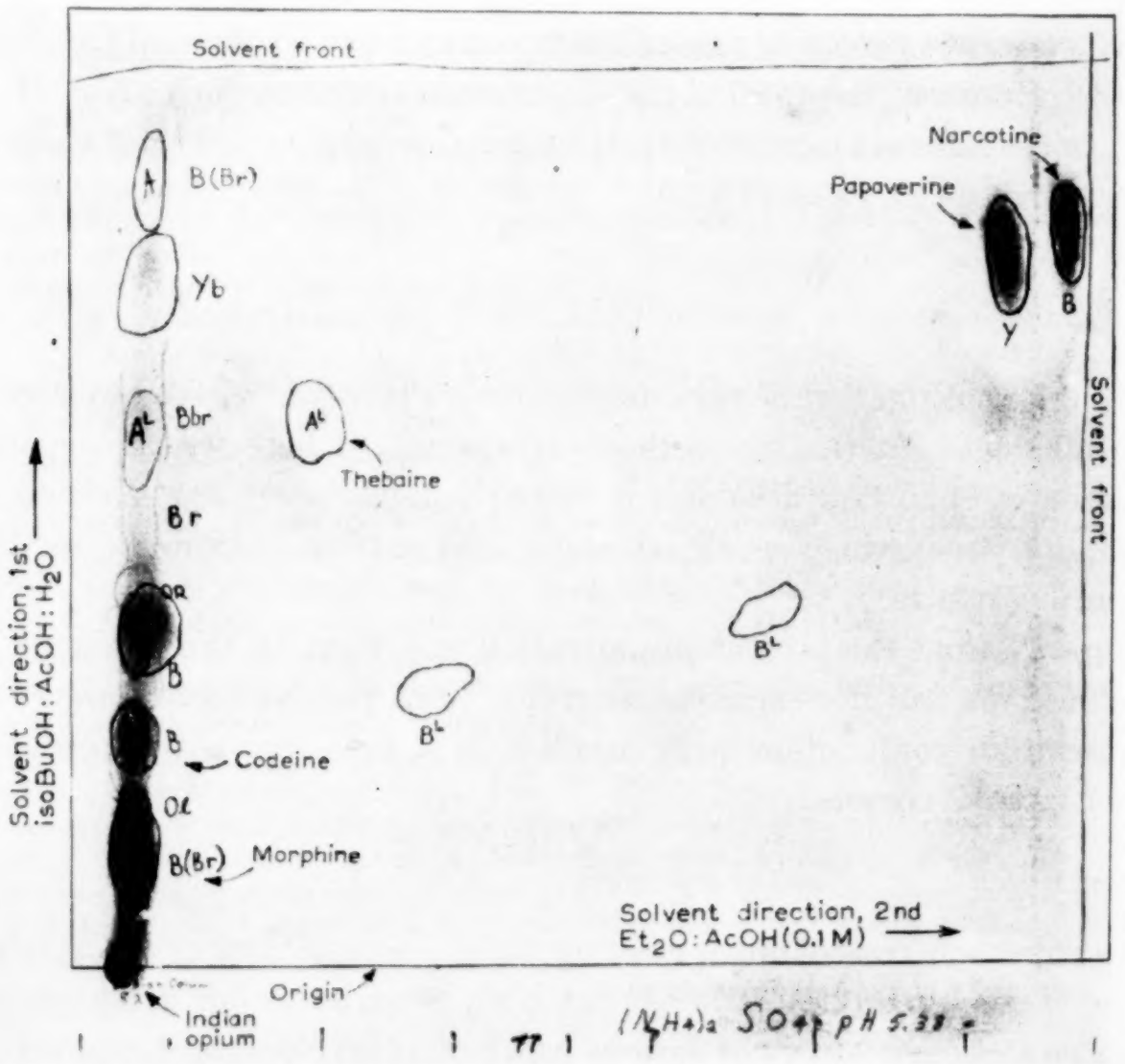


Fig. 4. Two-dimensional chromatogram of indian opium (export) in isobutanol–acetic acid and ether saturated with acetic acid (0.1 *M*) showing separation of papaverine and narcotine from morphine, codeine and thebaine.

The tendency for the alkaloids to streak or to be deposited over large ill-defined zones by the second solvent was the major drawback to most of the conditions studied. Of all the conditions tested, the best results were obtained by using paper treated with 2% $(NH_4)_2SO_4$, isobutanol–acetic acid 5:1 as the first solvent, and water-saturated ether as the second solvent (No. 6, Table III). Even so, the final narcotine and papa-

References p. 337.

verine spots were usually elliptical rather than round in shape, but the separation was clear-cut and there was no evidence of streaking (Fig. 4).

A considerable variation in the R_F values of narcotine and papaverine was obtained. In six experiments performed under the aforementioned conditions (Table

TABLE IV

R_F VALUES OF ALKALOIDS DEVELOPED WITH WATER-SATURATED ETHER IN SECOND DIMENSION
First dimension: isobutanol–acetic acid 5:1 on 2% $(NH_4)_2SO_4$-treated paper

Morphine	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Codeine	0.16	0.13	0.03	0.05	0.12_5	0.14
Thebaine	0.31_5	0.34	0.13	0.21	0.36	0.27
Papaverine	0.78	0.78	0.73_5	0.64	0.73	0.62
Narcotine	0.91	0.89	0.88	0.72	0.82	0.75
N/P ratio	1.17	1.14	1.20	1.13	1.13	1.21

IV), the R_F values of narcotine ranged from 0.72 to 0.91 and those of papaverine from 0.62 to 0.78. However, the ratio of the distances traveled by each alkaloid was fairly constant. In the same six experiments, the narcotine:papaverine ratio varied between 1.13–1.21 with a mean value of 1.16.

CONCLUSIONS

Following the investigation of various parameters involved in the paper chromatography of alkaloids, alternative methods are presented here for the separation and identification of important alkaloids in opium (namely morphine, codeine, thebaine, narcotine and papaverine), using an acetic acid extract obtained directly without further purification.

It appears from the present investigation and from all the available data that alcoholic systems will not separate narcotine from papaverine. However, by using these systems in conjunction with another in a two-dimensional procedure, this difficulty can be overcome.

Addendum

Since this paper was read (Annual meeting of the Forensic Society of Canada, October 1956), the thesis by BETTSCHART[25,26] has been brought to our attention. The work constitutes a thorough survey of various parameters involved in the chromatographic separation of tropine and opium alkaloids. On a more practical point of view, the author has used with advantage a butanol solvent associated with a phosphate–citrate buffer (pH 6.8) by descending paper chromatography for the separation of mixtures of pure morphine, codeine, narceine and thebaine. It is claimed that narcotine and papaverine can only be separated at a pH between 3 and 4.5, using ether as solvent. This is not in accord with our findings. The author does not suggest a definite technique for the separation of the five major alkaloids of opium in a single procedure. Buffered paper at two different pH values being required, a two-dimensional procedure is

References p. 337.

hardly feasible. The paper-chromatographic method has not been applied to the natural product.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to acknowledge the helpful technical assistance of Mr. FERNAND BILODEAU.

SUMMARY

Alternative methods are presented for the separation, by ascending paper chromatography, and the indentification of morphine, codeine, thebaine, narcotine and papaverine from crude extracts of raw opium and from mixtures of pure alkaloids. The influence of various parameters involved in the procedure is discussed. Although alcoholic systems will not separate narcotine from papaverine, this difficulty can be overcome by using acidified or aqueous ether as second solvent in a two-dimensional procedure.

REFERENCES

1 H. ASAHINA AND M. ONO, *United Nations Document Series*, ST/SOA/Ser.K/40 (1955).
2 Q. C. BELLES AND H. W. SIEVER, *J. Lab. Clin. Med.*, 46 (1955) 628.
3 R. A. CLAYTON, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 904.
4 L. R. GOLDBAUM AND L. KAZYAK, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1289.
5 D. N. GORE AND J. M. ADSHEAD, *J. Pharm. and Pharmacol.*, 4 (1952) 803.
6 V. E. KROGERUS AND L. TUDERMAN, *Suomen Apteekkariyhdistyksen Aikakaus-lehti*, No. 16 (1954) 245.
7 V. E. KROGERUS, *Suomen Kemistilehti*, B28 (1955) 117.
8 V. E. KROGERUS, I. RAUTIAINEN AND B. WESTERLUND, *Medd. Norsk Farm. Selskap*, 17 (1955) 198.
9 E. LEDERER AND M. LEDERER, *Chromatography: A Review of Principles and Applications*, 2nd Ed., Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1957.
10 J. LEVINE AND H. FISCHBACH, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 44 (1955) 543.
11 D. J. LUSSMAN, E. R. KIRCH AND G. L. WEBSTER, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 40 (1951) 368.
12 G. J. MANNERING, A. C. DIXON, N. V. CARROLL AND O. B. COPE, *J. Lab. Clin. Med.*, 44 (1954) 292.
13 Z. MARGASIŃSKI, A. SZYMAŃSKA AND I. WASILEWSKA, *Acta Polon. Pharm.*, 12 (1955) 65.
14 R. MUNIER AND M. MACHEBOEUF, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 1144.
15 R. MUNIER AND M. MACHEBOEUF, *Bull. soc. chim. biol.*, 32 (1950) 192.
16 R. MUNIER, M. MACHEBOEUF AND N. CHERRIER, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 1919.
17 R. MUNIER, M. MACHEBOEUF AND N. CHERRIER, *Bull. soc. chim. biol.*, 34 (1952) 204.
18 R. MUNIER, *Bull. soc. chim. France*, (1952) 852.
19 G. NADEAU, *Clin. Chem.*, 2 (1956) 347.
20 A. RESPLANDY, *Compt. rend.*, 238 (1954) 2527.
21 M. SCHMALL, E. G. WOLLISH AND E. G. E. SHAFER, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1373.
22 H. SCHMID, J. KEBRLE AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 1864.
23 A. B. SVENDSEN, *Pharm. Acta Helv.*, 26 (1951) 323.
24 A. B. SVENDSEN, E. D. AARNES AND A. PAULSEN, *Medd. Norsk. Farm. Selskap*, 17 (1955) 116.
25 A. BETTSCHART, *Promotionsarbeit*, Zürich, 1954.
26 A. BETTSCHART AND H. FLÜCK, *Pharm. Acta Helv.*, 31 (1956) 260.

Received April 3rd, 1958

A METHOD FOR THE PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF PHENOL DERIVATIVES, MOULD METABOLITES AND RELATED COMPOUNDS OF BIOCHEMICAL INTEREST, USING A "REFERENCE SYSTEM"

L. REIO

Wenner-Gren Institute, Department of Physiological Chemistry, University of Stockholm, and Department of Biochemistry, University of Lund (Sweden)

When dealing with the problem of correlating the production of different metabolic compounds, found in various strains of *Penicillia*, with their general biosynthetic pathways, great difficulties are encountered in the identification of these compounds, especially when they only occur in minor amounts. The pioneering work on mould-metabolic products as carried out by RAISTRICK and his colleagues (for reviews see Refs.[1,2,3]) led to the isolation and identification of a great number of compounds, such as phenol derivatives, tetronic acids, tropolones, etc., from large scale cultures of appropriate moulds by chemical methods.

In order to compare the production capacity of a number of different strains under various conditions, such as addition of antimetabolites or isotopes, it was found favourable, at least in preliminary experiments, to cultivate the moulds on a relatively small scale (100–500 ml of media). On the basis of preliminary paper-chromatographic studies of medium extracts from some *Penicillia* strains (*e.g. P. urticae* Bainier, *P. brevi-compactum*, *P. griseo-fulvum* etc.), EHRENSVÄRD[4,5] showed that 2–3 times as many compounds of "aromatic" character could be detected, as had been reported previously.

It was felt that when substances were found in the culture media (or in mycelia) even in very small amounts compared with the "main" products, these could, after proper characterization or identification, provide additional information regarding the possible precursors or reaction sequences in the biosynthesis of accumulated compounds.

As a basis for the investigations, a suitable "reference system" was worked out for comparative purposes. Since, as previously stated, mould-metabolic products are mainly related to the phenol or phenol-carboxylic acid type of compounds, the reference system had to cover a large number of the most simple phenol derivatives so that possible degradation and decarboxylation products could be detected. Furthermore, by courtesy of Prof. RAISTRICK, it was possible to include a large number of well-known mould metabolites. It was also found useful to collect a large group of non-aromatic compounds, mainly related to the TCA-cycle, and some of the more common natural products of vegetable origin, using the same procedure. The choice

References p. 373.

of substances was, of course, somewhat arbitrary, within the limits of their availability. In many cases the heterogeneity of the compounds proved to be of help in determining the group character of certain types of compounds.

The common paper-chromatographic procedure had to be adapted both to the investigation of the reference substances and to that of the extracts from culture media of moulds. This was done according to the following principles:

The chromatograms were run in six different solvent systems. Each of these was treated as a standard with ten spraying reagents. The limited choice of solvents and reagents was conditioned by the need for obtaining, within a reasonable time, adequate information on the chemical nature of the compounds involved.

To avoid the tedious and time-consuming task of spraying only one chromatogram at a time, a set-up was constructed that allowed six chromatograms at a time to be sprayed with ten standard reagents within a relatively short time (Fig. 1). The principle of this system is to apply the extract along a line on each of the six chromatographic papers and then develop them in six solvents. After drying, they are sprayed vertically with the ten reagents in adjacent strips (about 10 mm wide). When the level to which the substance has travelled is crossed by the vertical reagent strip, a roughly circular spot appears. From this the R_F value can be read off directly by means of a graduated elastic band. At the same time the shades of the colours produced by the action of the different reagents are recorded in numbers. For these colours, an arbitrary

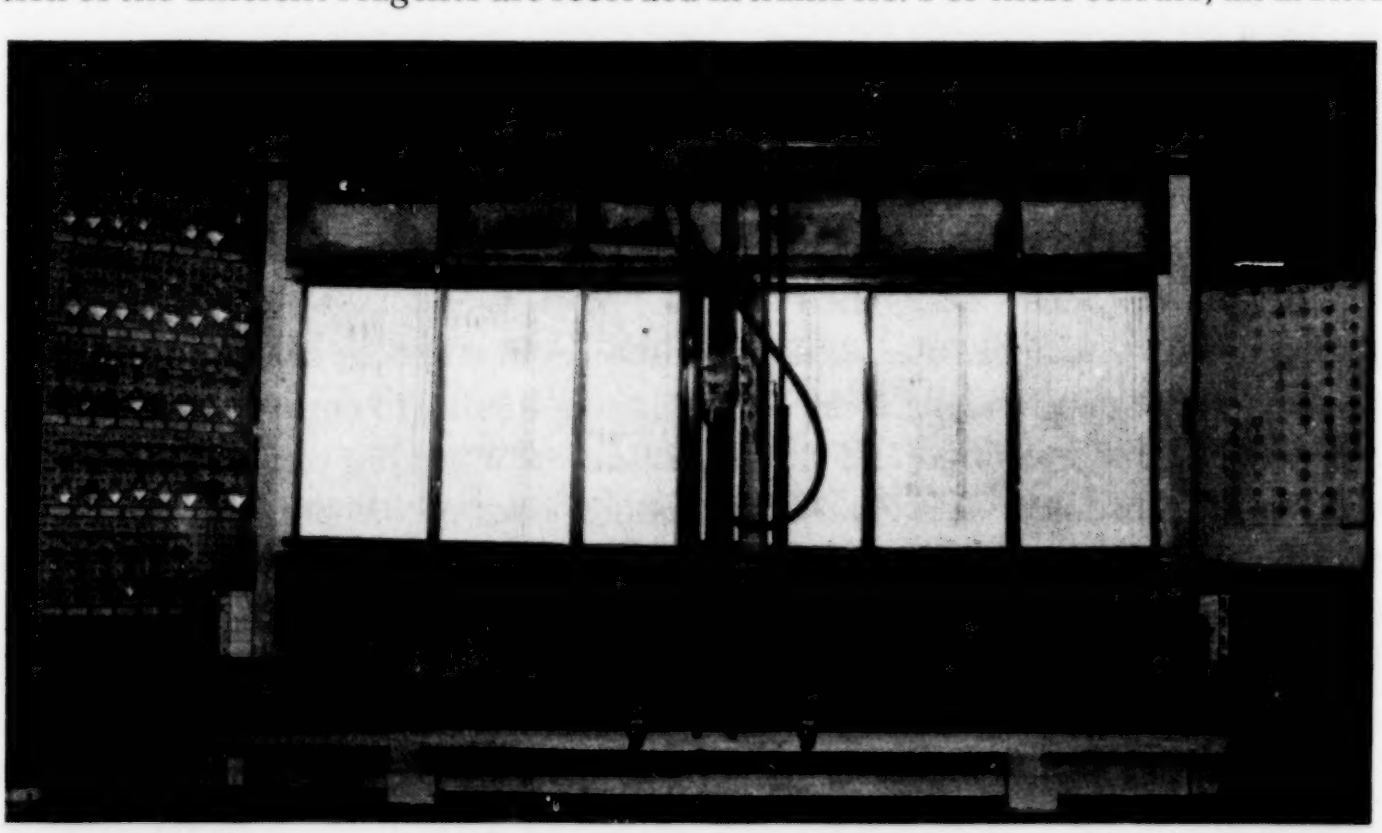


Fig. 1. Over-all picture of the spraying arrangement, placed on an 80 cm high table. Six papers from chromatographic solvent systems can be inserted simultaneously against an illuminated glass screen. The first section from the right shows that it is possible to spray at least 22 strips of reagents, vertically, on each paper of size 24 × 55 cm. The frame shown in the middle of the figure can be moved both horizontally and vertically. It is equipped with two retouching air brushes and is counterbalanced so as to allow an easy up and down movement when spraying. Between the air brushes and the paper there are two slits, 8 × 500 mm, which can only be moved horizontally together with the frame. At both sides of the plate where the slits are fixed, a graduated elastic band is attached, which is protected against sprinkling by an acrylate plate. The R_F values are read off directly and recorded after the band has been properly adjusted, by means of a screw, to the solvent front on the chromatogram.

References p. 373.

standard has been chosen according to the "Derwent" colour pencil shades for rapid recording (see the colour index given for the tables). When the colours are fully developed, the variation of the R_F values of a single component, which are represented horizontally by similar colour sequences in the six solvents, can easily be studied against an illuminated screen. An over-all idea of the results can thus be obtained during spraying. This was found to be advantageous in many cases when checking only the "typical" production picture of a single strain. For a complete record of the numerical data, consisting of R_F values and of a numbered code of colour reactions, the reader is referred to the experimental part of this work.

This system of characterizing unknown substances before attempting to isolate them in a crystalline form, has hitherto resulted in the identification of several new metabolites. For instance, GATENBECK[6] studied the biosynthetic background of anthraquinones and reported the presence of 3-hydroxyphthalic acid in *Penicillium islandicum* Sopp. In the culture media of *P. griseo-fulvum*[7] I detected, among other substances, orcinol and orsellinic acid, which have not been reported previously either in the case of *Penicillia* species or of any other moulds. Penicillic acid, which had earlier been found in several other species of *Penicillia*, was also shown to occur in this species. After isolation and chemical analysis of the three above-mentioned compounds, their identity was confirmed. LYBING AND HAGSTRÖM[8] described an interesting application of this method in an investigation of secretion products in egg water from sea urchin eggs.

GENERAL PROCEDURE

Extracts or mixtures of several compounds, which were subjected to paper-chromatographic investigation were run on Whatman No. 1 filter papers, 24 × 55 cm, in six different solvent systems designated as F, E, A, B, C and D. By drawing a funnel-shaped pen (Fig. 5) along a ruler, various substances in ethanolic solution were applied uniformly on the papers along a line 20 cm in length and 10 cm from the bottom of the paper. The line was dried and the procedure was repeated until the desired concentration of substances was obtained. On both sides of the line on each paper, 2 spots of a "standard" substance were applied in order to maintain a continuous control of the quality of the paper and the constancy of the solvent systems. Usually an extract of about 1 mg dry weight, containing up to 6 components was applied on one paper. However, in most cases it was advisable to test several concentrations in order to get the best separation. In the case of one substance only, the procedure was simplified and a line chromatogram was run in one solvent only. In the remaining five solvents, the substance was applied and run as a spot and developed using the best detection reagent, which was found by spraying a line chromatogram with 10 standard reagents. When there was less than 0.1 mg substance, the procedure could be modified so as to comprise spot-test reactions on filter paper and estimation of the R_F values for 6 spots, one for each solvent system.

The chromatographic papers were hung up for 1 h in the chromatographic jars for equilibration before the solvents were applied. After the chromatograms had been

References p. 373.

run for approx. 4 h in solvents F, E, A, and for 5 h in solvents B, C and D, the solvent front had reached a distance of about 40 cm from the starting line; the solvent front was then marked by a soft pencil. The papers were air-dried overnight at room temperature. This gave the best results when the indicator reagent was used for detecting acidic components. Spraying could even be performed after 2-hours' drying, but in order to get a positive response with the indicator reagent, this should be applied 3 times, followed by ammonia and $CuSO_4$, similarly to the procedure recommended for solvent system E. In the case of the other reagents, the drying time had no noticeable effect.

The six chromatograms were placed in the order F, E, A, B, C, and D against an illuminated screen (as shown in Fig. 1), where they remained during spraying and evaluation. After examining the chromatograms in U.V.-light, they were sprayed with 10 different reagents, and the colours were recorded. For detailed descriptions see the sections describing spraying technique, and colour estimation and recording respectively.

THE SPRAYING APPARATUS

The spraying apparatus was built from L-profile aluminum and ½ inch aluminum rods. The dimensions of the frame were: length 200 cm, height 120 cm and depth 35 cm. An earlier model constructed mainly from laboratory clamps and rods also proved satisfactory. In the middle of the frame, 6 separate sections were set up, corresponding to the size of the papers used, each provided with a glass plate. The sections were arranged so that they could be taken out for cleaning, by pushing them sideways. Each section consisted of a rectangular unit, made from L-profile stainless steel, on the inside of which the above-mentioned glass plate was fitted. Between the inside border of the L-profile unit and the glass a gap of about 1 mm is obtained when the glass plate is pushed backwards. The chromatogram was fastened by pushing the paper between the glass plate and the overlapping (10 mm wide) L-profile border surrounding the unit. No special clamps or tape had to be used to hold the chromatogram upright. This applies also to papers of other sizes, but of the same length.

Behind these sections two daylight lamps, each 1.5 m long, were built in, so as to avoid corrosion of the lamps. In order to secure maximum light intensity and a uniform light source (whereby colour photographs could also be taken), the lamp section was coated on the inside with aluminum foil. The upper part of the spraying apparatus was insulated against fluids and packed with absorbent filter paper in order to collect the rinsing-spray fluids. It is also recommended to connect this with a ventilation device.

At the front of the spraying apparatus there is a mobile rack carrying two air brushes, as shown in Fig. 2. For spraying, this is moved vertically; it can also be shifted horizontally from one paper to another, at a constant distance from the paper. The tips of the air brushes are fixed 9 cm from the surface of the paper. A plate coated with filter paper and provided with two adjustable slits, 8 × 500 mm, was placed between the chromatogram and the two air brushes, 1 cm from the paper surface. This could be moved since it was connected with the rack.

References p. 373.

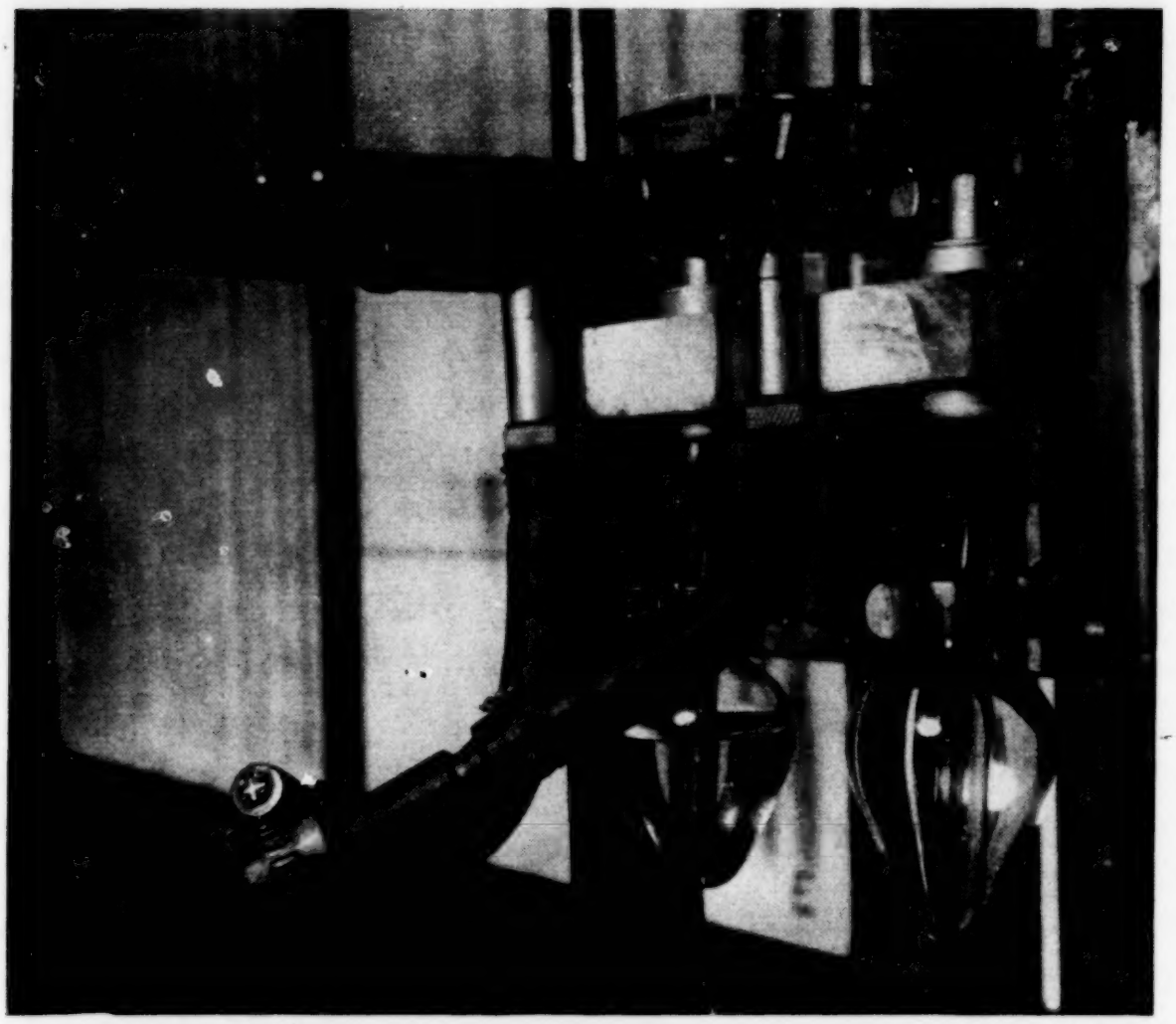


Fig. 2. Detail of that part of the movable frame to which the two air brushes and their reagent flasks are attached on an acrylate plate.

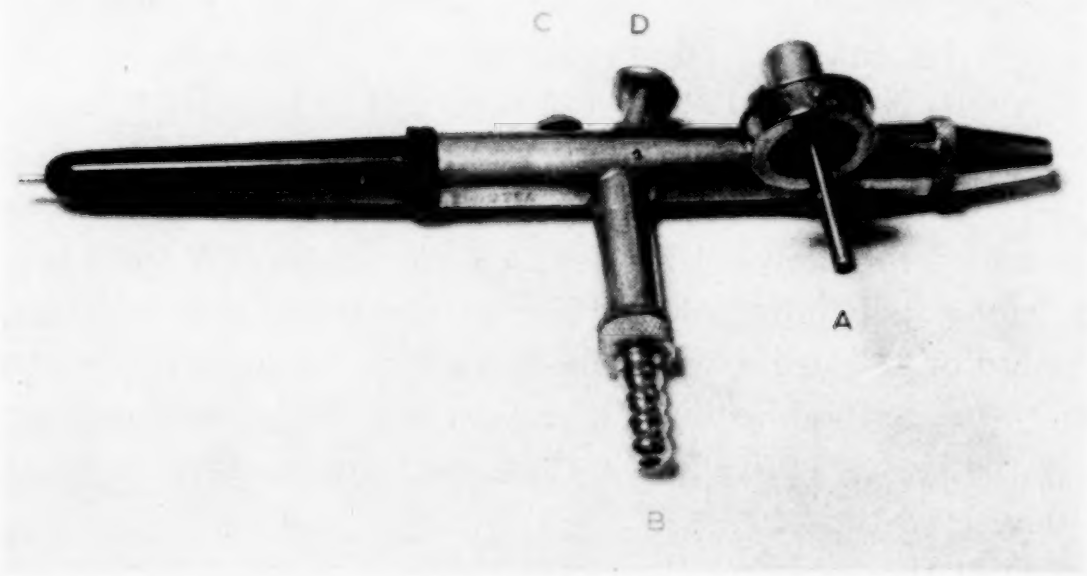


Fig. 3. Retouching air brush, type II B "Grafo", used for spraying the chromatograms. A: Inlet for reagents, which in this special case has been extended to reach the bottom of the reagent flask. B: Inlet for compressed air. C: Screw to regulate the quantity of solution sprayed. D: Push button to start the sprayer.

On both sides of the plate with the two slits, a graduated elastic band for R_F measurements was fixed. This could be adjusted with a screw to follow the variations of the solvent front on the chromatogram.

The R_F values for the centre of gravity of the single spots were read off by moving the rack horizontally adjacent to the spots. In some cases the R_F ordinates were drawn on the chromatograms in pencil.

The spraying screen was provided with a movable ultraviolet lamp. When turning the lights off (in a dark room), the fluorescent spots were outlined in pencil and the colour was recorded.

Fig. 1 shows a rack holding the reagents (left) and a colour index (right).

SPRAYING TECHNIQUE

For spraying, two "Grafo" Retouching Air Brushes, Type IIB were used (Fig. 3). These were operated with compressed air, but compressed nitrogen or carbon dioxide may also be used. The minimum working pressure being 2 atm, the air brushes were operated at 2.4 atm.

The sprayers were fitted on a mobile rack, which allowed horizontal and vertical movement at a constant distance from the chromatographic papers. The reagents were sprayed vertically one after another from the vessels containing 15 ml of the reagent solution. For continuous spraying during 2½ min approx. 15 ml of solution was required (tested with aqueous solutions). This is sufficient to allow the spraying of 60 strips, each 50 cm long, *i.e.* corresponding in all to 30 m chromatogram. The amount of spraying solution can be regulated to a certain extent, as can be seen in Fig. 3. Under normal conditions the spraying cone is adjusted so that about a 20 mm wide line of reagent is applied on the paper. Between the air brushes and the paper there are two slits, 8 × 500 mm, which can only be moved horizontally together with the frame. By this arrangement the reagent zone applied on the paper is reduced from 20 to 10 mm.

When one line has been sprayed on the first paper at a certain position, the sprayer is moved to the next paper and, at the same position, another line is sprayed. After the six chromatograms have been treated similarly the reagent solution is changed. The sprayer is washed for 10 sec with distilled water (or alcohol, depending on the reagent used or the one to be used).

Since the air brushes are precision instruments, the following precautions should be carefully observed:

The reagent solutions must be protected from dust and other visible impurities. Before pouring them into spraying-flasks, they should be filtered. When not in use they should be stored in tightly closed flasks as shown in Fig. 1. If the solutions become turbid, they must be refiltered.

The air brush must be carefully cleaned after use by blowing water of *ca.* 50° through it, especially when ammonia or phosphomolybdic acid have been used. Distilled water should be used for cleaning the brush between sprayings. Ethanol should be used before and after the reagent DB (= 2,6-dibromoquinone-4-chloroimide), otherwise the reagent will precipitate and block the channels in the air brush.

References p. 373.

In order to facilitate successive sprayings with two different reagents within the same strip, the following spraying scheme has proved useful:

Reagents	
Air brush I	*Air brush II*
Bromophenol blue	$CuSO_4$, for paper from solvent E only
—	Permanganate
Ferric chloride	—
Dinitrophenylhydrazine	—
Phosphomolybdic acid	Ammonia
D1, D2, D3 and D4 diazonium reagents	Ammonia
2,6-Dibromoquinone-4-chloroimide	Ammonia

Reagent flasks (15 ml) are hung up by two metal clamps on the rack to the left of the spraying arrangement (Fig. 1). The upper clamp supports the cap-type polyethylene stoppers and the lower holds the reagent flasks, which can thus be easily removed and transferred from the rack to the spraying apparatus and vice versa with one hand only.

SPRAYING REAGENTS

Diazotized sulfanilic acid = D1. 50 mg stable diazonium salt was dissolved in a mixture of 5 ml dioxane and 10 ml water at 0° and filtered. When not in use, the solution was stored in a refrigerator at the same temperature.

With most phenolic compounds and aliphatic keto acids, this reagent gave a yellow to orange colour—in very few cases a pink colour was produced—on exposing the sprayed strip to ammonia. Sometimes a spot developed even without ammonia.

Diazotized 4-benzoylamino-2,5-dimethoxyaniline = D2. 100 mg stabilized Zn salt was dissolved in a mixture of 5 ml dioxane and 10 ml water at 0°, filtered and stored in a refrigerator.

With the investigated phenolic compounds this reagent gave purple to red-violet colours—in a few cases yellow and brown colours were obtained—when the sprayed strip was exposed to ammonia.

Diazotized o-dianisidine = D3. 100 mg stabilized Zn salt was dissolved in a mixture of 5 ml dioxane and 10 ml water at 0°, filtered and stored in a refrigerator.

With the investigated compounds this reagent gave red to blue-violet colours —in a few cases brown or blue colours were obtained—when the sprayed strip was exposed to ammonia.

p-*Nitrobenzenediazonium fluoroborate = D4.* 60 mg dry diazonium salt was dissolved in a mixture of 5 ml dioxane and 10 ml water at 0°, filtered and stored in a refrigerator.

With the investigated compounds this reagent produced an orange-yellow colour—in some cases brown, violet and red colours were produced—on exposing the sprayed strip to ammonia. Very small amounts of ammonia are required to produce this reaction which is, in most cases, immediate.

2,6-Dibromoquinone-4-chloroimide = DB. 50 mg 2,6-dibromoquinone-4-chloro-

References p. 373.

imide was dissolved in a mixture of 12 ml CaH_2-dried dioxane and 3 ml dry acetone. The solution was filtered and stored in a refrigerator.

With phenolic compounds this reagent gave blue, green and gray colours—in some cases yellow and pink colours were obtained—on spraying the reagent strip with dilute ammonia.

Solutions of all the diazonium reagents and the DB-reagent were stored in pear-shaped flasks of 15 ml on a separate rack, which could easily be moved over to a refrigerator after spraying. The reagent solutions could be used up to 14 days after preparation. However, every day the background colour (blank test) increased in intensity. Dioxane was used in order to dissolve the diazonium salts more easily; cold 50% aqueous ethanol could also be used, but the solutions were then found to lose their activity after a week. Dioxane was purified from peroxides by treatment with CaH_2 for a few days and subsequent filtration. For suppressing the original colour in the D2 and D3 solutions, treatment with active carbon was successful, but afterwards the solutions remained stable only for a couple of days, owing to the change of pH in the solution. Addition of small amounts of acetic acid had no effect on the storing stability of the solutions.

Ferric chloride = *Fe*. 2% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ in water was used. If storing for longer times is desired, then the stock solution must be at least 6%. The use of saturated solutions of anhydrous ferric chloride in anhydrous dioxane or chloroform may sometimes be advantageous.

With the investigated compounds this reagent gave red-violet, blue or green colours, sometimes also brown, gray and yellow.

2,4-Dinitrophenylhydrazine = *DN*. 500 mg 2,4-dinitrophenylhydrazine was dissolved in 1000 ml hot 1 *N* HCl. The solution was filtered after a few days.

With aldehydic and keto compounds, this reagent gave yellow to orange colours; in rare cases other substances gave a positive reaction.

Potassium permanganate = *Mn*. This reagent consists of 1% aqueous solution of potassium permanganate. In some cases the use of slightly alkaline or acid permanganate was preferred.

With the compounds investigated, this reagent gave yellow-brownish spots on a red-violet background. Sometimes the spots were colourless owing to the strong reduction of the reagent to Mn^{+2} ion.

Phosphomolybdic acid = *Mo*. 2% aqueous solution of $H_3PMo_{12}O_{40} \cdot 29H_2O$ was used. In this case also the strip was sprayed with ammonia in order to develop the colours. Sometimes the colour development was immediate, even if ammonia was not used, and sometimes the colours changed when the reagent strip was exposed to ammonia. With the compounds investigated this reagent gave blue and gray colours; in rare cases yellow or green spots were obtained.

Bromophenol blue = *Ind*. 300 mg bromophenol blue was dissolved in 500 ml ethanol and 0.25 ml 30% sodium hydroxide was added in order to change the colour of the solution from red to blue.

With acids, this reagent gave yellow spots on a blue background. Chromatograms

References p. 373.

from the solvent system E did not give spots with the indicator reagent owing to the alkali remaining in the paper. In this special case, the bromophenol blue strip was once again sprayed with 2% aqueous solution of $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. The background then turned to light blue or gray and the spots obtained, indicating the position of acids, were blue, green or yellow.

Dilute ammonia. Dilute ammonia was used when spraying the diazonium reagents D1, D2, D3, D4 and DB and Mo. In the cases previously mentioned, the dilute ammonia solution was made up as follows: 1 part concentrated aqueous ammonia (25%) and 1 part ethanol.

Copper sulphate. This reagent was used for the detection of acids when bromophenol blue failed to react. The paper was first sprayed with a 2% solution of $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ in water and then with dilute ammonia. Practically all aromatic and aliphatic acids gave blue, green or brown spots on an almost colourless background.

Ninhydrin reagent = NH. Amino acids and biogenic amines were detected by spraying with 2% ninhydrin in butanol saturated with water and subsequent heating with an electric dryer.

Additional spraying reagents

For aliphatic acids. Aliphatic acids can also be detected by spraying with 1:4 diluted D3 reagent (*o*-dianisidine-diazotate) and subsequent spraying with 0.1% β-naphthol in 0.02 *N* sodium hydroxide. In this case the spots were almost colourless and the background turned dark violet[9].

The following stabilized diazonium compounds were also tested, both with regard to their usefulness for detecting phenolic compounds and the possibilities they offer for distinguishing between several compounds on paper chromatograms. About 0.7% solutions of diazonium compounds in 1 part dioxane and 2 parts water were used. These were: diazotized 4-amino-2-chlorodiethylaniline $ZnCl_2$ salt, *o*-aminoazotoluene-diazotate, anthraquinone-1-diazonium chloride, diphenylamine-4-diazonium sulphate, 1-diazo-2-naphthol-4-sulphonic acid, NNCD-reagent = 2-chloro-4-nitrobenzenediazonium naphthalene-2-sulphonate (previously described as reagent in paper chromatography[10]) and tetrazotized *o*-dianisidine. The latter shows colour reactions which are similar to those of *o*-dianisidine-diazotate. However, the shades of the colours were deeper.

"Genochrome" reagent. 2% aqueous solution of *p*-aminodiethylaniline sulphur dioxide was prepared. This reagent was stable at room temperature for two weeks. When spraying with this reagent aromatic aldehydes immediately gave orange to red spots on a colourless background. The latter turned brown-gray after several hours. Aromatic ketones and phenols do not react under these conditions. Other applications of the "Genochrome" reagent have been described in ref.[11].

Phenolic compounds gave yellow, violet, blue and brown colours when the reagent strip was sprayed the second time with 0.1% aqueous solution of sodium periodate.

Bromophenol blue and hydroxylamine hydrochloride reagent. 150 mg hydroxylamine·HCl was dissolved in 14 ml bromophenol blue solution (Standard Indicator

References p. 373

solution) and 1 ml water. The pH of the solution was adjusted to 7.2 with a few drops of 2 *N* NaOH. Aromatic aldehydes reacted rapidly and gave yellow spots on a blue background. Ketones failed to react under the prevailing conditions.

p-*Phenylenediamine reagent.* With aromatic aldehydes, freshly prepared 1% aqueous solution of *p*-phenylenediamine gave yellow to orange colours against a bluish-gray background[12].

Azobenzene-phenylhydrazine sulphonic acid. With aromatic aldehydes 0.5% aqueous solution of azobenzene-phenylhydrazine sulphonic acid upon successive spraying with 1 *N* HCl gave after a few minutes yellow to bluish-green spots on an almost light-brownish background[13].

Pyridine and acetic anhydride reagent. This reagent was made up of 7 parts by volume of pyridine and 3 parts by volume of acetic anhydride, according to GODIN[14]. It was found useful in distinguishing between some aliphatic dicarboxylic acids. With the compounds listed in Tables XVIII, XIX, XX and XXI, the following colours were obtained with this reagent:

(1) In U.V. only:

glyceric, mesoxalic and β-ketoglutaric acids	light blue
citric acid, ketipic acid diethyl ester	blue-green
dl-tartaric acid	green

(2) Visible:

oxalacetic acid, itaconic acid	red-violet
fumaric acid	yellow
trans- and *cis*-aconitic acid, acetylenedicarboxylic acid	brown

Cyanoacetic acid ester reagent for 1,4-quinones[15]. 1 ml cyanoacetic acid ethyl ester in 14 ml ethanol was sprayed. On subsequent spraying with dilute ammonia the colours obtained with the following compounds were:

thymoquinone, 2,6-xyloquinone, 1,4-benzoquinone	blue
1,4-naphthoquinone, 2-methyl-1,4-naphthoquinone	violet
3-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone	red

For other reagents, which might in some special cases be useful, the reader is referred to the comprehensive treatise by LEDERER AND LEDERER[16].

THE CHROMATOGRAPHIC APPARATUS

The chromatographic apparatus consists of six rectangular glass jars (20 × 30 cm and 60 cm high), for six different solvent systems, designated as A, B, C, D, E, F. Each jar is provided with two glass troughs, each of which takes two chromatographic papers, 27 × 55 cm. However, sheets of Whatman No. 1 filter paper 24 × 55 cm were used throughout the experiments. These were cut from large sheets of Whatman paper, the downward flow of solvent being parallel to the machine-direction of the paper. The troughs were supported and kept fixed in the right position by means of a Pyrex glass-rod frame as shown in Fig. 4.

References p. 373.

For the solvents A, B, C and D a smaller glass dish, about 5 cm deep, containing the water phase of the solvent is placed at the bottom of the jar. In order to keep the atmosphere in the jar saturated with water, two strips of thick paper, approx. 18 cm wide, fixed under the respective troughs, were hung up so as to reach the bottom of the dish. The jar was lined from the bottom to a height of about 10 cm with a strip of thick paper. This was necessary in order to maintain saturation with the organic solvent. The organic solvent covered the bottom of the jar (around the dish) to a height of approx. 1 cm. If, after some time, the level rose to about 4–5 cm the solvent in the jar was entirely replaced. The top of the jar was covered by a glass plate, which was ground so that it fitted tightly; no grease was required. The jars were placed in a

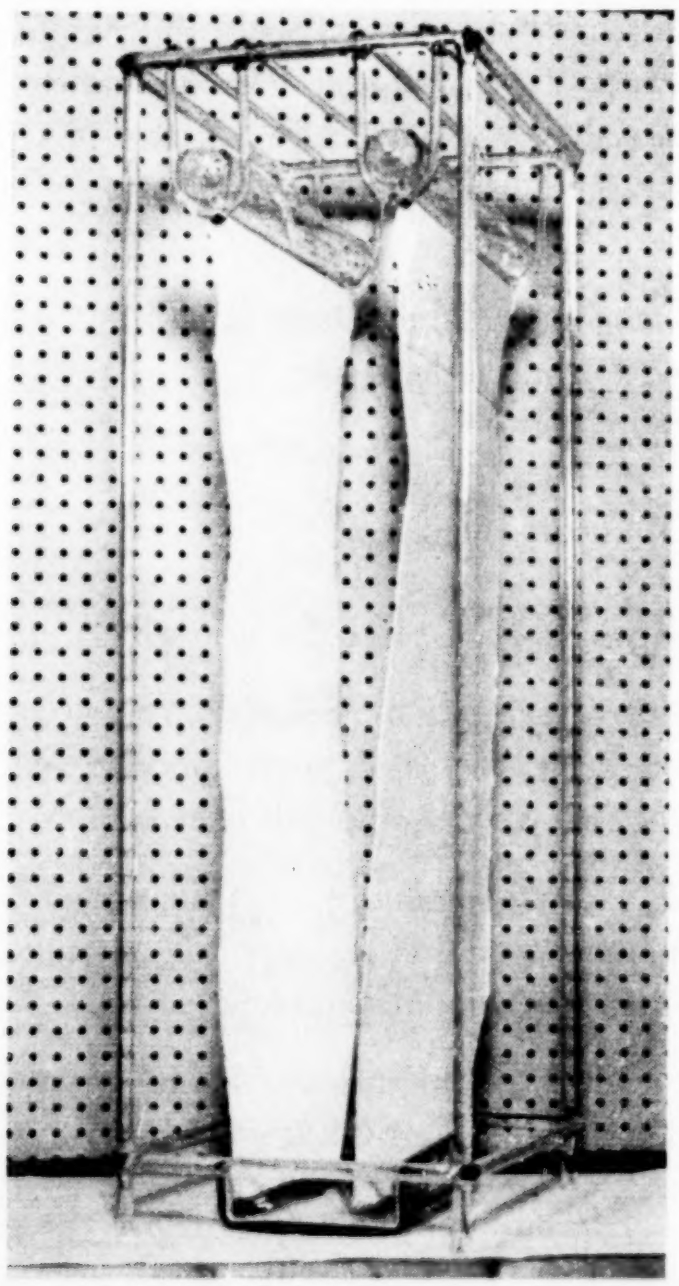


Fig. 4. Pyrex glass frame inside the chromatographic jars. The bottom solution containing the water phase is placed in a rectangular dish.

constant temperature-controlled room at 21°. The solvents were prepared in 10-l portions, which kept well; they were stored in bottles provided with stopcocks, through which the solvents were poured into the troughs.

CHROMATOGRAPHIC SOLVENTS

Six different solvent systems were used in the investigation of reference substances

References p. 373.

and metabolic products from *Penicillium* series. These solvents were originally composed by HÖGSTRÖM[17] for that purpose.

Solvent F. The solvent consisted of a mixture of ethyl methyl ketone 80 parts, acetone 4 parts, water 12 parts and formic acid (100%) 2 parts by volume.

Solvent E. The solvent consisted of a mixture of ethyl methyl ketone 921 parts, water 77 parts and diethylamine (100%) 2 parts by volume.

Solvent A. 1000 ml methyl isobutyl ketone was shaken for 1 h with 100 ml 4% formic acid (4 ml formic acid and 96 ml water). The two phases were separated

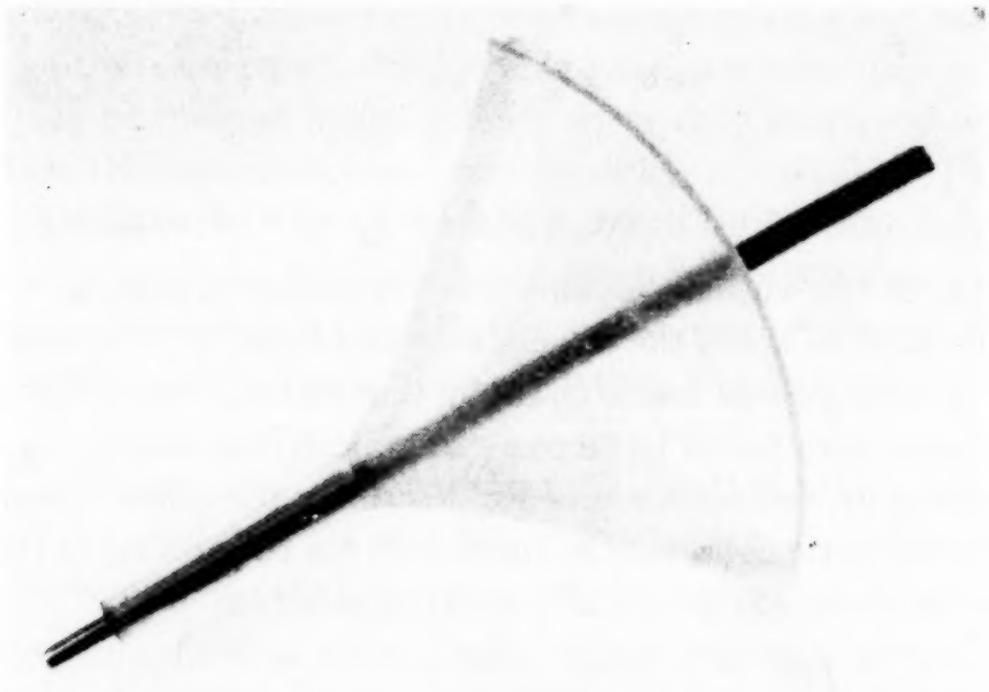


Fig. 5. "Pen" for application of substance solutions in narrow lines on chromatographic paper. The "pen" is made from a polyethylene funnel and a pin of stainless steel and has been devised by Dr. S. LYBING in this laboratory. (Magnification 2×.)

and the clear organic phase was used as mobile phase. The water phase was placed in a separate container at the bottom of the chromatographic jar.

Solvent B. 1000 ml chloroform (stabilized, containing 1% ethanol) was shaken for 1 h with 200 ml solvent of the following composition: 100 parts methanol, 96 parts water and 4 parts by volume formic acid. After separation, the organic phase was used as mobile phase and the water phase was placed in a separate container at the bottom of the jar.

Solvent C. A mixture of 900 ml benzene and 100 ml ethyl methyl ketone was shaken for 1 h with 100 ml 2% formic acid (2 ml formic acid and 98 ml water). After separation, the organic phase was used as mobile phase and the water phase was placed in a separate container at the bottom of the jar.

Solvent D. 1000 ml benzene was shaken for 1 h with 100 ml 2% formic acid. After separation, the organic phase was used as mobile phase and the water phase was placed in a separate container at the bottom of the jar.

All solvents used were C.P. grade and no extra purification was found to be necessary. In the case of both formic acid and diethylamine 100% products were used. Distilled water was used in all preparations.

References p. 373.

Usually 10 l of each solvent were prepared. The solvents were stored tightly closed for 9 months and in our experience storing does not influence their developing power in chromatographic separation. However, especially when using systems B, C, D and E, it was found necessary to change the bottom solvent in the chromatographic jars, as well as the solvent in the troughs every second month. The temperature in the room where the jars were placed was kept as close to 21° as possible by means of thermostatic control.

After mixing the solvents with equal amounts of 90% aqueous ethanol, the pH for each solvent was found to be as follows:

Solvent	F	E	A	B	C	D
pH value	2.7	10.0	3.9	4.8	4.3	5.8

COLOUR ESTIMATION AND RECORDING OF DATA

Colour recording of the chromatograms was performed according to an arbitrary standard colour chart, in which the colours were numbered in 72 shades. This followed the "Derwent" colour pencils index made by Cumberland Pencil Co. Ltd. England. Other colour charts were found to be more complicated to handle for everyday use. These colour shades proved satisfactory for describing the colour reactions employed in this investigation, although many of them were not used owing to the fact that the difference between them was practically indistinguishable.

For comparative purposes, single colours were applied with colour pencils as spots, about one inch in diameter, on Whatman No. 1 paper strips. Within the same spot the colour was applied in such a way that its intensity varied. The best results were obtained by rubbing the spots, after they had been drawn, with cotton moistened with carbon tetrachloride. Six series of 12 spots each were numbered and the whole was fixed between acrylate plates, as seen on the right in Fig. 1.

After each spraying with a reagent, the index number of the colour produced was immediately indicated with a soft pencil on the chromatographic spot. At the same time the spot was encircled. In some cases when the colours altered quickly, within a few seconds, from one definite colour to another, two numbers were indicated in the spot. An immediate evaluation was necessary, since most of the colours produced by the action of different reagents were unstable or were changed by the vapours of other reagents in the neighbourhood. As previously stated, the colours were read off against an illuminated screen. The main difficulty was to avoid subjective evaluation of colours. It is also important not to neglect errors caused by variations in the concentrations of the substances, which influence the colour intensity, or the possible overlapping of another substance or impurity. However, the colour reactions recorded in Tables I–XXI, obtained with approx. 25 γ of substance on an area of 10 × 20 mm, indicate rather good agreement of the colour pattern with that of the structural analogues of the same substance. Even if they are recorded as one of the numbers of a sequence, for instance 30, 31 or 32, 33, this does in practice refer to the same colour. This variation in colour shades occurred during the investigation of reference sub-

References p. 373.

stances, when using on purpose a special numerical code instead of the chemical nomenclature in designating the substances during spraying, in order to avoid subjective colour estimation. At the same time various types of compounds were investigated in order to obtain reliable information concerning the reagents used. Slight deviations in the indicated colours, especially when diazonium reagents were used, as compared later with those of structural analogues, demonstrated the limits of the probable experimental error.

It should be pointed out that in many cases, well-known colour reactions for certain compounds could not be detected with the concentrations used on the paper (for instance ferric chloride produces a colour with resorcinol in a test tube experiment, but here the result was negative). On the other hand, some unusual reactions may be due to impurities, which give mixed colours when they overlap the substances. In these cases, where the impurities had distinctly different R_F values, they could easily be overlooked. Another effect, which is mainly caused by the rate of the reaction, has been observed when spraying the same substance from six different solvent systems. This is obviously connected with the different amounts of acid or alkali remaining in the paper. The colour pattern turns out almost the same, but develops at a different speed.

When the total amount of substance was smaller than about 200 μg, the colour reactions were first tested as spots on a filter paper and the R_F values were afterwards estimated by developing one spot for each solvent system with the best detection reagent.

The colour in ultraviolet light was estimated before spraying, the same colour index being used, and the fluorescent regions were drawn by pencil. However, the

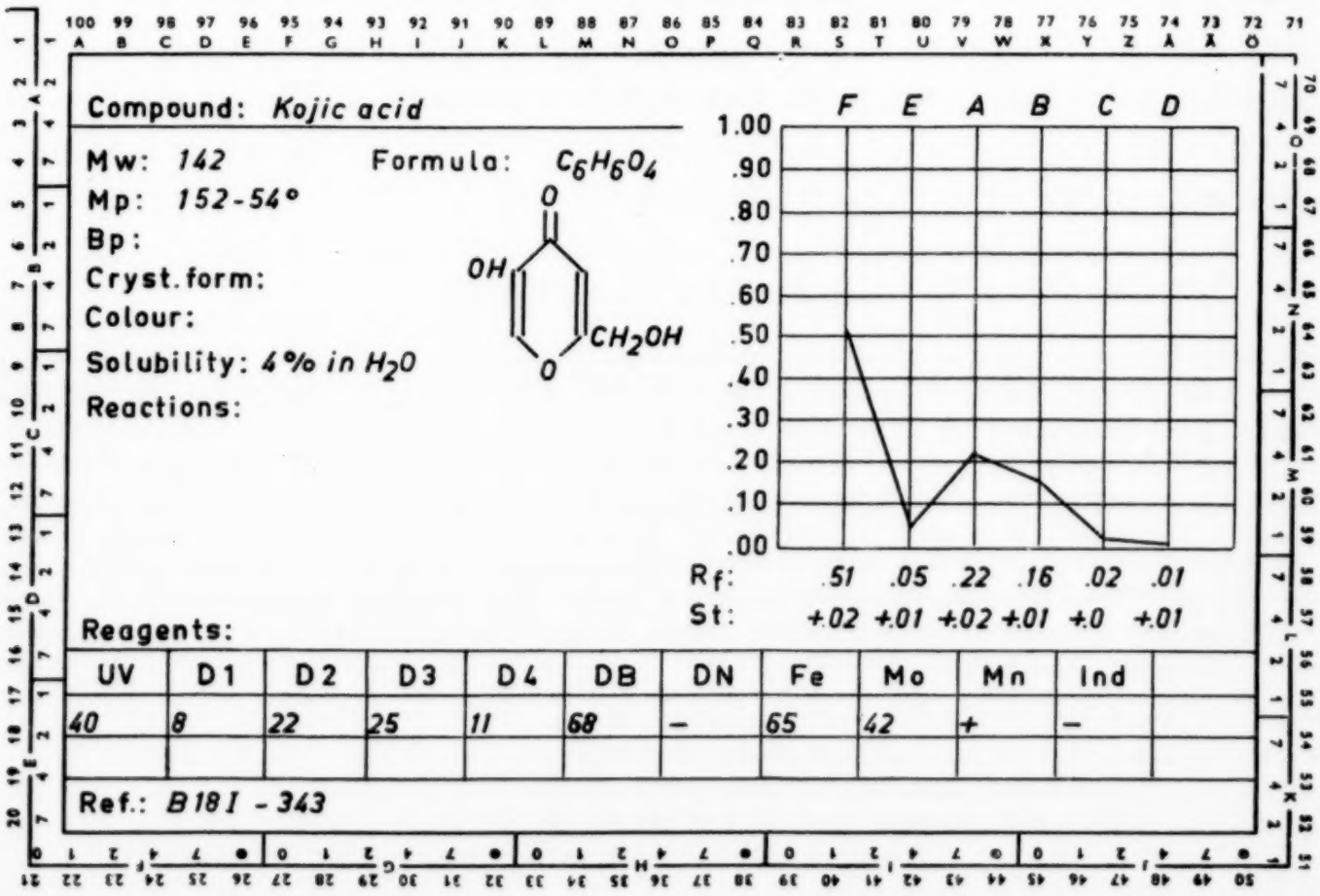


Fig. 6. Sample of record cards for the reference substances.

References p. 373.

accuracy was much less when dealing with strongly fluorescent substances, the brightness of which varied with the pH of the filter paper. Some additional information was obtained when after spraying, the sprayed areas were inspected in U.V. These colour-shifts were not included in the Tables.

Single substances of the reference system were recorded on special punched cards, as shown in Fig. 6. The R_F values were entered on the R_F-network as a diagram. The colours were recorded by numbers on a special section of the cards and were also indicated by means of the colour pencils. A complete record of the numerical data obtained from mixtures, which data consisted of R_F values and of a numbered code of colour reactions, was made with a typewriter on special forms of 22 × 36 cm size. Each form was divided vertically into 6 parts corresponding to the solvent systems used. Each part was divided in turn into 12 vertical columns for the reagents used. Different R_F levels were indicated horizontally. The code-numbered colour reactions were entered horizontally on the forms alongside the appropriate R_F values, representing the colour-reaction sequence for a single substance (or several substances in the case of overlapping). By connecting the middle of the six similar colour sequences, a diagram is obtained, which can be redrawn on the same form on a smaller scale on the R_F-network for comparative purposes. This smaller diagram (of which six on each form were reserved for that purpose) corresponds in size to the R_F-network used for recording the compounds on the special cards of the reference system and can be compared directly as to the type of diagram and mean colour sequence.

When all components of the mixture give almost the same colour pattern, which is often the case when homologous compounds are present, it is sometimes advisable to number the different spots uniformly on 6 chromatograms which appear to belong together. Evaluation is facilitated when the spot areas are connected after the spraying is finished, so that a diagram is obtained. When freshly sprayed, the different spots can be more easily distinguished as to their reactivity and their relative differences in size. Also rapid shifts of colour shades could in many cases be of help in localizing the R_F-position of one and the same substance.

GUIDE TO TABLES I–XXI

The following Tables present information compiled for approx. 450 organic compounds, investigated by the procedure outlined in the previous sections. The R_F values are recorded from six different solvent systems designated by F, E, A, B, C and D. For the composition of these solvents, see the list of abbreviations given below. Under the heading "Detection" (columns 2–11) the colour reactions are recorded for 10 different reagents used for the identification of each compound; in addition, the colour produced in ultraviolet light is indicated in the first column under this heading. The amount of substance used in these experiments was 25–50 γ per spot, which produced different colours when the reagents were applied to them. These colours are referred to by numbers, the explanation of which is found in the colour index. For abbreviations of the reagents, the reader is referred to the following section.

Table I	Monohydric phenols and their derivatives.
Table II	1,2-Dihydric phenols and their derivatives.
Table III	1,3-Dihydric phenols and their derivatives.
Table IV	1,4-Dihydric phenols and their derivatives.
Table V	1,2,3- and 1,3,5-Trihydric phenols, derivatives and related compounds.
Table VI	Naphthalene derivatives.
Table VII	Benzoic acid derivatives.

References p. 373.

Table VIII Aromatic non-phenolic monocarboxylic acids with the COOH group in the side chain and their derivatives.
Table IX Aromatic non-hydroxylated di-, tri- and tetracarboxylic acids, and their derivatives.
Table X Aromatic and heterocyclic amino acids.
Table XI Biologically active nitrogen compounds, *e.g.* biogenic amines, etc.
Table XII Coumarin derivatives.
Table XIII 1,2- and 1,4-Pyrone derivatives.
Table XIV Naturally occurring tropolones.
Table XV Natural products of vegetable origin, *e.g.* pinosylvin, hesperetin, quercetin, etc.
Table XVI Miscellaneous compounds.
Table XVII Metabolic products from moulds and *Penicillium* species.
Table XVIII Unsaturated aliphatic mono-, di- and tricarboxylic acids.
Table XIX Aliphatic dicarboxylic acids.
Table XX Aliphatic hydroxy acids.
Table XXI Aliphatic keto acids and hydroxy- and keto-compounds of biological interest.

ABBREVIATIONS USED IN TABLES I–XXIV

Chromatographic solvent systems:

F = Ethyl methyl ketone–acetone–formic acid–water
E = Water–ethyl methyl ketone–diethylamine
A = Methyl isobutyl ketone–formic acid–water
B = Chloroform–methanol–formic acid–water
C = Benzene–ethyl methyl ketone–formic acid–water
D = Benzene–formic acid–water

For preparation of the different solvents see the section on *Chromatographic solvents*.

Reagents used for detection:

U.V. = Ultraviolet light
D1 = Diazotized sulfanilic acid
D2 = Diazotized 4-benzoylamino-2,5-dimethoxyaniline
D3 = Diazotized *o*-dianisidine
D4 = *p*-Nitrobenzenediazonium fluoroborate
DB = 2,6-Dibromoquinone-4-chloroimide
DN = 2,4-Dinitrophenylhydrazine
Fe = Ferric chloride
Mo = Phosphomolybdic acid
Mn = Potassium permanganate
Ind = Bromophenol blue

For preparation of the various reagents see the section on *Spraying reagents*.

Owing to the lack of space in the Tables, the R_F values have been recorded as 12, 56, 88 but should be read: 0.12, 0.56, 0.88 etc. The colours produced by the reagent are recorded as numbers, and the corresponding shades can be found in the colour index. The — sign means that no reaction was observed under the prevailing conditions. The + sign indicates an uncertain reaction, which was too weak to deserve colour estimation. Reactions with the reagents Mn and Ind are only indicated by the signs: —, + or ++. The ++ sign means that a positive reaction was obtained immediately. In the few cases where the colours are recorded by a number placed on top of another number, *e.g.* $\begin{matrix}24\\57\end{matrix}$, this indicates that immediately upon spraying, a violet spot (24 in the colour index) appears which, within a few seconds, turns to light brown (57 in the colour index). Usually most colours are unstable and after some time take on a brownish tone, which is to some extent caused by the chemical influence of other reagents used in the vicinity. This change in colour is not recorded in the tables, nor is there any column for those compounds that, at this low concentration, are visible on the chromatograms because of their own colour.

References p. 373.

COLOUR INDEX FOR THE TABLES

The colours produced by the action of different reagents on the investigated compounds, presented in Tables I–XXIV, have been recorded by number, according to the following code:

01 Zinc Yellow
02 Lemon Cadmium
03 Gold
04 Primrose Yellow
05 Straw Yellow
06 Deep Cadmium
07 Naples Yellow
08 Middle Chrome
09 Deep Chrome
10 Orange Chrome
11 Spectrum Orange
12 Scarlet Lake
13 Pale Vermilion
14 Deep Vermilion
15 Geranium Lake
16 Flesh Pink
17 Pink Madder Lake
18 Rose Pink
19 Madder Carmine
20 Crimson Lake
21 Rose Madder Lake
22 Magenta
23 Imperial Purple
24 Red Violet Lake
25 Dark Violet
26 Light Violet
27 Blue Violet Lake
28 Delft Blue
29 Ultramarine
30 Smalt Blue
31 Cobalt Blue
32 Spectrum Blue
33 Light Blue
34 Sky Blue
35 Prussian Blue
36 Indigo
37 Oriental Blue
38 Kingfisher Blue
39 Turquoise Blue
40 Turquoise Green
41 Jade Green
42 Juniper Green
43 Bottle Green
44 Water Green
45 Mineral Green
46 Emerald Green
47 Grass Green
48 May Green
49 Sap Green
50 Cedar Green
51 Olive Green
52 Bronze
53 Sepia
54 Burnt Umber
55 Vandyke Brown
56 Raw Umber
57 Brown Ochre
58 Raw Sienna
59 Golden Brown
60 Burnt Yellow Ochre
61 Copper Beech
62 Burnt Sienna
63 Venetian Red
64 Terra Cotta
65 Burnt Carmine
66 Chocolate
67 Ivory Black
68 Blue Grey
69 Gunmetal
70 French Grey
71 Silver Grey
72 White = colourless

TABLE I

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME MONOHYDRIC PHENOLS AND THEIR DERIVATIVES

R_F values × 100						Compounds	Detection										
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D1*	*D2*	*D3*	*D4*	*DB*	*DN*	*Fe*	*Mo*	*Mn*	*Ind*
91	95	93	91	92	92	Phenol	—	05	08	08	60	38	—	—	—	+	—
90	93	88	93	92	90	Anisole	—	08	14	21	08	32	—	—	—	+	—
93	95	98	97	93	88	*o*-Cresol	—	—	06	—	08	38	—	—	—	+	—
94	94	97	96	93	88	*m*-Cresol	—	05	06	11	08	38	—	—	—	+	—
94	95	96	96	92	87	*p*-Cresol	—	—	06	06	08	72	—	—	—	+	—
95	90	91	93	90	90	4-Chloro-*m*-cresol	33	08	13	60	08	32	—	—	—	+	—
93	91	92	92	92	90	2,3,6-Trichloro-*p*-cresol	—	06	60	17	57	69	—	—	71	+ +	+
90	88	95	89	92	92	2,3-Xylenol	—	08	10	15 08	08	25	—	—	30	+ +	—
93	95	94	96	96	88	2,4-Xylenol	—	—	64	64	08	—	—	—	30	+	—
94	94	92	97	96	90	2,5-Xylenol	—	57	06	08	60	30	—	—	30	+	—
95	94	92	97	96	91	2,6-Xylenol	—	—	07	21	—	28	—	—	40	—	—
91	94	91	95	94	89	3,4-Xylenol	—	—	06	—	—	—	—	—	30	—	—
88	93	93	94	93	88	3,5-Xylenol	—	—	07	—	08	67	—	—	—	+	—
89	92	97	96	93	91	2,3,5-Trimethylphenol	—	—	07	08	64	28	—	—	30	+	—
88	86	93	95	93	92	2,4,5-Trimethylphenol	—	07	07	61	64	—	—	—	—	+ +	—
92	90	97	90	92	89	2-Propenylphenol	—	—	—	07	09	38	—	—	30	+	—
95	91	91	94	93	92	4-*tert.*-Butylphenol	—	—	10	19	—	31	—	—	30	+ +	—
94	91	94	95	94	94	4-*tert.*-Octylphenol	—	—	10	19	—	—	—	—	—	+	—
94	96	84	93	92	92	Carvacrol	—	07	08	09	08	33	—	—	30	+ +	—
90	92	97	96	93	92	Thymol	—	—	07	08	66	24	—	—	30	+	—
93	93	86	94	92	92	3-Methyl-4-*tert.*-butylphenol	—	—	07	09	06	25	—	—	—	+ +	—
50	83	42	29	06	00	*o*-Aminophenol	—	06	58	58	64	35	60	63	57	+ +	—
75	91	76	40	12	06	*m*-Aminophenol	71	11	15	65	63	25	—	52	68	+ +	—
25	72	07	06	00	00	*p*-Aminophenol	—	27	—	—	66	69	—	25	52	+ +	—

(Contd. on p. 355)

TABLE I *(continued)*

R_F values × 100						Compounds	Detection										
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D1*	*D2*	*D3*	*D4*	*DB*	*DN*	*Fe*	*Mo*	*Mn*	*Ind*
92	68	92	88	87	88	*o*-Nitrophenol	65	06	—	—	62	—	—	—	—	+	—
93	86	88	89	89	67	*m*-Nitrophenol	65	06	—	—	09	—	—	—	—	+	—
92	65	87	88	83	47	*p*-Nitrophenol	65	—	—	—	60	—	—	26	—	+	—
92	67	88	95	92	91	2,4-Dinitrophenol	65	—	—	—	60	—	72	—	—	+	++
97	64	92	93	93	92	2,5-Dinitrophenol	65	—	—	—	—	—	72	57	—	+	+
94	74	91	93	95	93	2,6-Dinitrophenol	65	—	—	—	60	—	72	—	—	+	++
76	83	34	13	36	30	Picric acid	65	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++
94	73	93	94	92	93	4,6-Dinitro-*o*-cresol	65	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
91	69	93	92	92	78	6-Nitro-*m*-cresol	53	—	—	52	10	—	72	57	48	+	—
82	86	80	29	86	76	2,4,6-Trinitro-*m*-cresol	65	—	—	57	—	—	72	—	—	+	++
85	90	78	66	58	24	Saligenin	—	03	13	13	09	33	—	26	—	+	—
84	90	91	80	70	51	5-Methylsaligenin	—	—	—	06	11	—	—	30	30	+	—
84	83	89	90	85	60	2-Hydroxyacetophenone	—	15	—	62	13	38	06	—	—	++	—
89	89	83	90	89	71	3-Hydroxyacetophenone	—	06	60	64	12	39	03	24	—	+	—
87	76	87	87	81	42	4-Hydroxyacetophenone	—	—	—	—	13	—	07	—	—	+	—
91	82	89	88	86	58	4-Hydroxypropiophenone	—	07	—	—	09	—	05	—	—	+	—
93	47	90	84	90	64	Salicylaldehyde	33	06	03	06	—	38	06	25	—	+	—
94	92	87	88	83	55	3-Hydroxybenzaldehyde	—	—	—	—	—	38	06	—	—	+	—
94	69	85	85	80	37	4-Hydroxybenzaldehyde	—	03	—	63	—	—	08	—	—	+	—
90	90	93	88	93	89	Anisaldehyde	—	—	—	—	—	32	03	—	—	+	—
94	92	93	93	90	88	3-Methylsalicylaldehyde	—	09	12	65	10	43	06	25	—	+	—
92	51	92	87	86	52	Salicylic acid	33	06	—	—	07	—	—	24	—	+	+
92	11	92	78	88	33	Thiosalicylic acid	33	01	07	07	08	12 21	—	58	30	++	+
92	97	91	83	59	17	1,1-Hexahydrophenolcarboxylic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
92	38	88	73	79	50	O-Carbomethoxysalicylic acid	34	—	—	—	06	—	—	—	—	—	+
90	37	84	83	92	64	3-Chloroacetylsalicylic acid	33	—	—	—	08	33	—	24	—	+	++
94	67	86	87	85	70	5-Chlorosalicylic acid	33	—	—	—	08	—	—	25	—	+	++
91	09	86	45	35	01	3-Hydroxybenzoic acid	—	06	—	65 58	07	33	—	—	—	+	+
80	35	72	37	11	00	2-Hydroxymethyl-3-hydroxybenzoic acid	33	08	—	65	12	34	—	+	—	+	+
80	64	72	62	37	08	4-Hydroxyphthalide	33	03	—	64	58	—	—	24	—	+	—
88	08	91	37	28	01	4-Hydroxybenzoic acid	—	06	—	65 58	07	—	—	03	—	+	+
93	93	92	89	87	64	4-Hydroxybenzoic acid methyl ester	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
92	13	93	92	87	74	Anisic acid	—	—	—	—	07	—	—	03	—	—	+
93	11	92	39	43	05	4-Aminosalicylic acid	34	11	12	63	12	26	—	65	—	++	+
41	21	09	00	00	00	5-Aminosalicylic acid	48	—	62	64	03	53	—	65	68	++	++
73	68	45	05	15	03	3,5-Dinitrosalicylic acid	69	—	—	—	08	—	—	59	—	—	++
83	03	77	20	43	03	3,5-Dinitro-4-hydroxybenzoic acid	65	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++
92	20	93	89	88	70	*o*-Cresoxyacetic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++
92	18	90	92	84	59	*m*-Cresoxyacetic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++
91	19	88	92	84	59	*p*-Cresoxyacetic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++
94	61	92	92	92	72	3-Methylsalicylic acid	33	06	—	—	07	33	—	24	—	+	+
94	55	92	91	90	67	4-Methylsalicylic acid	33	06	—	—	08	33	—	23	—	+	+
91	46	89	90	89	65	5-Methylsalicylic acid	38	—	—	—	—	—	—	25	—	++	+
88	62	78	90	85	68	6-Methylsalicylic acid	33	08	08	62	09	35	—	23	—	+	+
89	10	87	91	82	74	3-Methoxyphenylacetic acid	—	—	—	—	57	—	—	—	—	—	+
87	08	87	91	82	74	4-Methoxyphenylacetic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
91	08	88	58	50	05	4-Hydroxyhydrocinnamic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
94	18	94	68	52	00	*o*-Coumaric acid	33	08	11	65 07	07	41 35	03	03	32	++	+
90	94	96	92	88	58	*o*-Coumaric acid methyl ester	33	06	07	09	62	41	—	—	60	++	—
90	27	94	50	74	25	4-Hydroxyphenylpyruvic acid	33	—	06	25	08	50	06	—	—	++	+
92	03	80	07	04	00	5-Hydroxy-3-indoleacetic acid	03	14	65	25	62	68	—	—	30	++	+
83	00	60	08	05	00	3-Hydroxyphthalic acid	33	—	—	57	09	35	—	65	—	+	++
68	04	62	12	07	00	2-Hydroxyisophthalic acid	33	—	—	—	08	—	—	64	—	—	+
86	02	92	24	13	00	4-Hydroxyisophthalic acid	33	—	—	—	—	—	—	65	—	—	++

TABLE II

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME 1,2-DIHYDRIC PHENOLS AND THEIR DERIVATIVES

R_F values × 100						Compounds	Detection										
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D1*	*D2*	*D3*	*D4*	*DB*	*DN*	*Fe*	*Mo*	*Mn*	*Ind*
88	88	86	57	55	10	Pyrocatechol	—	17	70	—	63	35	50	50|67	57	+	—
90	93	89	94	92	91	Guaiacol	—	08	14	22	08	35	—	—	68	++	—
89	93	94	94	92	92	Veratrole	—	08	14	21	—	32	—	—	—	+	—
92	79	92	80	79	35	3-Methylpyrocatechol	—	71	17	18	12	35	50	54	57	+	—
93	91	95	82	76	32	4-Methylpyrocatechol	—	12	24	21	62	35	71	52	60	+	—
91	92	87	93	95	91	4-Methylguaiacol	—	17	10	62	24	68	—	58	30	++	—
91	92	93	95	93	95	Eugenol	—	—	10	56	64	42|09	—	—	30	++	—
89	91	96	96	94	91	Isoeugenol	—	—	—	—	60	07	—	—	30	++	—
92	89	88	95	92	93	Isoeugenol acetate	—	05	—	—	—	—	—	—	—	+	—
77	69	72	57	32	17	Vanillyl alcohol	—	—	12	22|12	11	35	—	—	30	+	—
83	77	83	80	58	43	*o*-Vanillyl alcohol	—	09	12	65	25	35	58	56	52	++	—
90	85	92	90	86	82	5-Hydroxymethyl-eugenol	—	13	10	13	—	32	03	—	30	+	—
85	81	88	83	74	62	4-Ethylhydroxymethylguaiacol	—	—	13|06	14|08	60	35	—	—	30	+	—
84	67	91	93	92	90	*o*-Vanillin	33	07	10	12	12	41|38	07	68	48	++	—
83	85	87	94	92	89	*o*-Veratraldehyde	—	17	—	—	—	32	07	—	—	+	—
92	71	96	93	92	93	*o*-Vanillin acetate	33	08	10	15	10	38	03	71	03	+	—
86	44	88	48	28	01	Protocatechualdehyde	—	—	—	—	59|64	50	07	43	06	++	—
83	81	94	89	78	67	Isovanillin	33	07	10	12	12	41	07	68	48	++	—
84	44	92	90	84	78	Vanillin	—	—	—	—	62	38	07	—	—	++	—
87	89	88	94	92	92	Veratraldehyde	30	06	03	63	10	33	07	—	—	+	—
86	83	86	84	95	92	Piperonal	—	—	—	—	—	—	07	—	—	+	—
88	23	94	94	89	92	4-Acetoxy-5-methoxyisophthal-aldehyde	48	06	—	—	—	—	03	27	04	+	—
88	73	93	89	82	73	Coniferyl aldehyde	38	07	07	07	—	07|27	—	—	—	+	—
88	86	87	93	94	92	3,4-Dimethoxyacetophenone	—	07	65	21	06	33	06	—	—	+	—
88	01	85	61	38	06	3-Methoxy-4-hydroxy-ω-hydroxy-methyl-acetophenone	34	08	—	24	09|60	33	+	—	71	+	—
88	34	84	39	38	04	2,3-Dihydroxybenzoic acid	32	13	—	—	12	34|05	—	30	68	+	+
93	12	93	92	86	78	*o*-Veratric acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++
84	03	67	05	02	00	Protocatechuic acid	—	13	—	—	59	71	—	42	57	+	+
83	04	89	62	42	08	Vanillic acid	—	08	—	65	07	33	—	08	68	++	+
80	05	94	91	78	67	Veratric acid	—	—	—	—	—	—	—	08	—	—	+
84	07	87	93	83	93	3,4-Dimethoxyphenylacetic acid	—	06	13	14	57	34	—	—	—	+	+
87	04	89	81	61	23	3-Methoxy-4-hydroxyphenylpropionic acid	—	—	—	—	60	27	—	—	—	+	+
78	02	76	08	03	00	Caffeic acid	40	03	22	58	62	42|53	—	42|67	03	++	+
83	02	87	68	41	12	Ferulic acid	33	—	17	25|64	14	25	—	59	40|71	+	+
85	03	85	89	72	49	3,4-Dimethoxycinnamic acid	33	—	—	—	06	—	—	58	—	+	+
93	31	97	92	86	47	2-Methoxy-5-propylphenoxyacetic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++
92	26	88	92	89	84	5-Methoxy-6-hydroxyisophthal-aldehydic acid	48	—	—	—	—	—	03	—	—	—	+
81	00	81	79	70	23	4-Methoxy-5-hydroxyisophthal-aldehydic acid	33	—	—	—	64	—	06	58	—	+	+
83	00	63	09	06	00	4-Hydroxy-5-methoxyisophthalic acid	30	03	—	—	08	—	—	24	—	—	+

TABLE III

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME 1,3-DIHYDRIC PHENOLS AND THEIR DERIVATIVES

R_F values × 100						Compounds	Detection										
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D1*	*D2*	*D3*	*D4*	*DB*	*DN*	*Fe*	*Mo*	*Mn*	*Ind*
88	91	83	22	28	02	Resorcinol	34	05	15	21	11	65	—	—	—	+	—
88	89	88	18	32	02	*m*-Propoxyphenol	—	08	15	23	12	25	—	—	29	+ +	—
89	93	89	42	57	08	2-Methylresorcinol	—	05	15	21	12	25	—	—	68	+	—
94	90	91	38	43	05	Orcinol	34	07	15	65	12	26	—	—	68	+	—
88	84	91	60	66	17	4-Ethylresorcinol	—	—	14	22	12	65	—	—	30	+ +	—
90	91	91	88	88	81	4-Hexylresorcinol = caprokol	—	07	15	23	12	65	—	—	30	+ +	—
83	79	94	44	59	10	4-Chlororesorcinol	—	06	14	19	12	25	—	—	30	+ +	—
92	61	91	87	85	42	2,4-Dihydroxybenzaldehyde	—	07	19	22	09	68	07	61	—	+ +	—
92	73	94	89	90	60	4-Methyl-2,6-dihydroxybenzaldehyde = atranol	65	06	12	65	10	68	03	69	42	+	—
88	62	88	85	83	49	2,4-Dihydroxyacetophenone = resacetophenone	03	03	15	21	09 | 63	70	+	65	—	+	—
90	82	88	90	90	67	2,6-Dihydroxyacetophenone	—	07 | 48	19	23	11	25 | 51	+	70	51	+ +	—
87	27	83	22	33	01	2,4-Dihydroxybenzoic acid	—	02	15	22	09	24	—	24	68	+	+
94	93	93	94	93	92	2,4-Dimethoxybenzaldehyde	34	06	08	62	—	—	08	—	03	+	—
77	02	77	01	01	00	3,5-Dihydroxybenzoic acid	—	—	15	19	08	25	—	57	25 | 30	+ +	+
72	74	61	14	23	04	2,6-Dihydroxybenzoic acid	—	02	15	21	09	29	—	25	—	+	+
93	28	93	47	52	02	Orsellinic acid	—	11	14	22	08	25	—	24	—	+ +	+
88	81	74	49	68	18	*p*-Orsellinic acid	—	06	19	21	08	24 | 69	—	28	—	+	+
92	04	83	02	04	00	4-Bromo-3,5-dihydroxybenzoic acid	—	08	19	22	08	28	—	—	30	+	+
89	87	87	83	90	88	2,5-Dimethyl-4,6-dihydroxybenzoic acid methyl ester	—	08	15	21	07	25 | 51	—	—	51	+	—
92	94	94	93	93	93	2-Methyl-4-methoxy-6-hydroxybenzoic acid methyl ester	—	07	07	23	08	38	—	—	—	—	—
79	00	54	02	00	00	3,5-Dihydroxyphthalic acid	33	07	—	21	10	27	—	65	—	+	+
78	00	62	05	00	00	3,5-Dihydroxy-6-methoxyphthalic acid	33	07	—	19	09	25	—	25 | 65	01	+ +	+
79	02	62	79	25	11	Dihydroresorcinol	—	06	15	15	03	56	—	58	71	+ +	+
86	04	92	82	65	46	5,5-Dimethyldihydroresorcinol	—	—	11	12	01	—	—	62	—	+ +	+
84	78	84	18	31	02	Hexahydroresorcinol	—	11	14	19	12	25	—	—	30	+ +	—
92	59	93	95	93	94	2-Nitro-5-methylresorcinol	65	07	19	65	09	69	—	—	—	+ +	—
94	49	95	91	80	75	4-Nitro-5-methylresorcinol	65	07	19	64	09	69	—	52	—	+ +	—

RESULTS AND DISCUSSION

This investigation is an attempt to systematize common paper-chromatographic analytical methods in order to make it possible to carry out with a reasonable degree of probability, a preliminary identification of the structure of phenolic compounds derived from biological sources, especially those arising from the metabolism of fungi. It has mainly been based on the comparative study of compounds collected into a suitable reference system, in which six R_F values were presented in diagrams together with their corresponding colour-reaction patterns. The values were compared with similar data obtained when unknown extracts were examined.

References p. 373.

TABLE IV

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME 1,4-DIHYDRIC PHENOLS AND THEIR DERIVATIVES

R_F values × 100						Compounds	Detection										
F	E	A	B	C	D		U.V.	D1	D2	D3	D4	DB	DN	Fe	Mo	Mn	Ind
87	92	79	15	20	01	Hydroquinone	—	72	51	72	13	58	—	—	42| 70|	+	—
74	61	26	16	03	00	Hexahydroquinone = quinitol	—	—	—	—	—	—	—	—	71	+	—
94	93	93	91	95	94	*p*-Butyloxyhydroquinone	—	09	62	62	14	35	—	—	28	+ +	—
89	85	90	35	42	05	Toluhydroquinone	—	56	—	—	11	—	—	—	71	+	—
88	93	94	48	60	16	2,6-Xylohydroquinone	—	—	72	72	—	67	—	—	30	+	—
95	94	97	84	90	72	Thymohydroquinone	—	72	13	72	—	69	—	—	30	+ +	—
75	02	58	03	02	00	Gentisic alcohol	34	52	56	52	51	70	—	+	42| 30|	+ +	—
50	00	15	00	00	00	2,5-Dihydroxymethylhydroquinone	33	—	—	06	08	69	—	—	30	+	—
97	97	95	82	80	42	Gentisic aldehyde	33	—	—	—	60	70	07	28	30	+	—
88	90	87	89	86	58	2,5-Dihydroxyacetophenone	64	05	06	06	08	54	+	70	01	+	—
91	86	94	93	91	93	2-Hydroxy-5-methoxyacetophenone	03	06	06	06	60	—	—	68	50	+ +	—
83	78	86	15	19	01	*p*-Benzoquinone	—	—	—	—	63	—	—	—	57	+ +	—
88	88	87	28	39	05	Toluquinone	13	72	72	72	57	69	03	—	30	+ +	—
91	92	90	93	86	87	2,6-Xyloquinone	70	—	57	—	—	68	—	—	30	+ +	—
95	93	95	93	92	91	Thymoquinone	70	—	13	—	—	—	—	—	40	+ +	—
29	00	02	00	00	00	2,3,5,6-Tetrahydroxymethylquinone	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	— *
31	01	05	00	00	00	Nitranilic acid	59	08	—	—	—	—	—	—	40	+	+
93	dec**	86	94	87	88	2-Methyl-3,5,6-trichloroquinone	—	72	72	72	72	24	—	—	70	+	—
88	36	82	19	25	00	Gentisic acid	38	72	—	—	58	70	—	28	68	+	+
64	04	15	00	00	00	3,6-Dihydroxyphthalic acid	38	72	72	72	14| 72|	53	—	28	30	+ +	+
89	20	82	10	14	00	2,3-Dicyanohydroquinone	33	72	72	72	72	53	—	29	27	+	—
89	87	93	93	90	88	4,4′-Dihydroxydiphenyl	—	—	—	—	10	—	—	—	—	+	—

* The colour of the compound itself 09.
** Decomposition.

In all about 450 compounds were investigated with regard to their behaviour towards six chromatographic solvent systems and ten colour reagents. About 2,700 R_F values were recorded, as well as some 4,000 colour reactions. Owing to the great number of data obtained from these records it is not possible to discuss them in detail here, and I have, therefore, confined myself to describing the more marked effects of certain types of compounds on the R_F values and colour reactions.

In order to give an over-all picture of the effect that different substituents in the phenolic nucleus have on the R_F values in different solvent systems, a selection of appropriate data is presented in Table XXII (p. 370).

For most compounds listed the approximate R_F ranges are given regardless of the position of the different substituents in the phenolic nucleus. As can be seen from Table XXII, the best separations were obtained with dihydric phenols. For these phenols, a differentiation has been made according to the position of the OH groups: 1,2; 1,3; 1,4. This could serve as a base when taking into account that each additional group, such as alkyl, halogen, aldehyde or acetyl (or ether groups), increases the R_F values to a certain extent, as is the case in solvents B, C, D. An additional carboxyl-

References p. 373.

TABLE V

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME 1,2,3- AND 1,3,5-PHENOLS, DERIVATIVES AND RELATED COMPOUNDS

R_F values × 100						Compounds	Detection									
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D1*	*D2*	*D3*	*D4*	*DB*	*DN*	*Fe*	*Mo*	*Mn*	*Ind*
82	00	67	08	05	00	Pyrogallol	—	58	65	65	10	60	55	57	57	+	—
86	92	95	95	87	88	1,3-Dimethoxypyrogallol	—	19	21	24	12	35	—	62	70	+ +	—
88	00	87	44	48	05	4-Ethylpyrogallol	66	08	64	64	06	—	—	70	68	+	—
82	65	60	01	01	00	Phloroglucinol	—	02	65	65	12	70	—	—	68	+	—
87	92	95	95	88	87	Trimethoxyphloroglucinol	—	—	—	—	12	57	—	—	—	—	—
81	00	66	07	07	00	2,4,5-Trihydroxytoluene	—	17	64	64	—	—	57	69	31 | 25	+	—
88	90	85	94	93	92	Trimethoxygallic aldehyde	—	—	—	—	07	—	06	—	—	+	—
88	31	95	35	32	00	Phloroglucinol aldehyde	—	07	64	65	11	66	07	66	—	+ +	—
84	89	86	95	80	71	Trimethoxyphloroglucinol aldehyde	33	—	—	—	—	—	07	—	—	—	—
79	07	84	67	48	19	Gallacetophenone	—	06	13	12	06	52	+	52	51	+ +	—
88	68	96	51	39	00	Acetylphloroglucinol	—	03	65	21	12	69	+	24	30	+	—
77	03	80	04	03	00	Pyrogallol-4-carboxylic acid	34	24	25	25	08	62	—	63	59	+ +	+
73	00	38	00	00	00	Gallic acid	—	09 | 70	20	65	09	52	—	68	03 | 10	+	+
82	02	78	73	29	05	Syringic acid	—	19	19	22	12	35	—	57	68	+ +	+
81	09	96	92	84	77	Trimethoxygallic acid	—	19	—	—	—	—	—	08	—	+	+
86	87	93	87	92	85	Trimethoxygallic acid methyl ester	—	06	61	62	06	70	—	—	—	—	—
83	04	82	57	34	07	5-Hydroxytoluquinone	—	—	22	22	60	—	03	—	—	+ +	—
90	00	38	00	00	00	*m*-Digallic acid	—	—	19	17	08	03	—	68	05	+ +	+
24	00	02	00	00	00	Shikimic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
08	09	00	00	00	00	*d*-Quinic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+

(the effect of which is included in this Table), hydroxymethyl-, hydroxy- or amino-group decreases the value, especially in solvents E, B, C and D. Since solvent E is basic, the presence of a carboxyl group in any structure is demonstrated by a considerable lowering of the R_F value in this solvent. This low value is significant for carboxyl groups and is confirmed by a positive reaction with the indicator reagent. Biogenic amines, coumarins and pyrones could also have relatively low R_F values in solvent E, but they gave negative reactions with the indicator reagent.

For simple monohydric phenols, especially with additional alkyl, halogen or ether groups, the resolving power of the solvents was poor, as was to be expected considering the solvents used. The solvents were originally evolved for investigations of metabolic products from *Penicillium* species, but were later extended to cover a large group of other organic compounds of biochemical interest. In this particular case it was sometimes an advantage to separate rapidly the simple phenols, which have high R_F values in all solvents, from compounds of the phenolic carboxylic acid type. In fact, the latter type predominates in products of mould metabolism. For other metabolic compounds found in moulds (including tetronic acids, pyrones, tropolonic acids, compounds from the TCA-cycle and those with more complex structures, for instance erdin and others), the solvents have proved to give satisfactory resolution, at least solvents E, B and C have with mixtures of up to 10 components.

References p. 373

TABLE VI

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME NAPHTHALENE DERIVATIVES

R_F values × 100						Compounds	Detection										
F	E	A	B	C	D		U.V.	D1	D2	D3	D4	DB	DN	Fe	Mo	Mn	Ind
90	92	89	94	90	93	2-Acetonaphthone	33	—	—	—	—	03	03	—	—	—	—
92	18	93	92	88	85	α-Naphthylacetic acid	57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
92	90	95	94	92	88	1-Naphthol	—	13	22	25	19	36| 25|	—	13| 26|	27	++	—
92	52	95	87	90	68	1-Hydroxy-2-naphthoic acid	32	09	22| 64|	65	63	35	—	68	24| 71|	++	++
92	91	94	93	92	84	2-Naphthol	—	—	22	25	15	43	—	—	27	++	—
94	49	92	79	88	49	2-Hydroxy-3-naphthoic acid	01	12	25	25| 35|	15	70	—	28	71	++	++
94	94	92	93	92	91	1,2-Naphthoquinone	13	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
93	82	93	56	63	06	1,3-Dihydroxynaphthalene	—	08	19	23	64	53	—	07	08	++	—
92	92	93	58	81	17	1,4-Dihydroxynaphthalene	33	08	23	23	25	68	—	28	28	++	—
92	92	88	91	92	92	1,4-Naphthoquinone	65	13	52	26	15	—	—	—	27	++	—
91	19	93	93	91	84	2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone	63	62	—	62	66	—	01	—	—	+	—
93	93	95	94	96	94	2-Methyl-1,4-naphthoquinone	65	03	—	—	—	—	—	—	34	++	—
92	33	85	91	83	87	2-Methyl-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone	70	+	+	+	+	—	—	60	+	+	—
86	89	89	52	75	12	1,5-Dihydroxynaphthalene	33	24| 15|	25	25	12	25	—	—	66	++	—
87	88	89	47	66	11	1,6-Dihydroxynaphthalene	69	12	25	25	11	25	—	65	25	++	—
95	92	94	54	69	10	1,7-Dihydroxynaphthalene	32	15	65| 25|	24| 35|	62	35	—	25| 28|	45| 68|	++	—
94	92	94	37	60	05	2,6-Dihydroxynaphthalene	32	14	63| 25|	25| 28|	65	45	—	48	45| 68|	++	—
92	88	89	39	45	03	2,7-Dihydroxynaphthalene	—	—	23	25	19	67	—	—	43| 68|	++	—

However, interpretation in such cases was rather difficult, but was somewhat facilitated when the R_F data were combined with the results of the estimation of the colour reactions with ten different reagents.

Unsuccessful separation of simple monohydric phenols could, to some extent, be compensated by carefully studying the colour-reaction patterns, since these are rather informative when it comes to discriminating between several possible structures. The simple phenols also proved useful for the study of miscellaneous colour reactions when correlating structural characteristics with the colour produced by different reagents. On introducing a hydroxymethyl-, aldehyde-, nitro- or acetyl-group into a simple phenol, the R_F values in solvents C and D decrease to a different extent. If an additional carboxyl group is present, the R_F values fall significantly in solvents E, B, C and D. An amino group causes a similar lowering of the R_F values in solvents B, C and D, but in solvent E the R_F remains more or less the same. A simultaneous decrease in solvents F and A should also be interpreted as significant for the presence of an amino group.

References p. 373.

TABLE VII

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME BENZOIC ACID DERIVATIVES

R_F values × 100						Compounds	Detection						Remarks
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D4*	*DN*	*Fe*	*Mn*	*Ind*	
88	20	98	92	87	79	Benzoic acid	—	—	—	—	—	+	
95	93	94	92	93	92	Hexahydrobenzoic acid	—	—	—	—	—	+	
90	90	94	92	92	94	Acetophenone	—	—	+	—	—	—	
96	90	97	94	94	93	Benzaldehyde	—	07	06	—	+	—	
88	28	85	88	86	80	*o*-Chlorobenzoic acid	—	—	—	—	—	++	
90	39	95	92	92	91	*m*-Chlorobenzoic acid	—	—	—	—	—	++	
94	92	95	94	93	93	*m*-Chlorobenzaldehyde	—	—	06	—	+	—	Mo-71
94	37	91	92	89	92	*p*-Chlorobenzoic acid	—	—	—	—	—	+	
90	46	95	92	92	84	3,4-Dichlorobenzoic acid	—	—	—	—	—	+	
96	16	88	90	80	29	*o*-Nitrobenzoic acid	70	—	—	—	—	+	
96	45	94	88	85	76	*m*-Nitrobenzoic acid	65	—	—	—	—	++	
95	90	94	93	94	92	*m*-Nitrobenzoic acid methyl ester	65	—	—	—	—	—	Mo-71
91	90	91	89	88	86	*m*-Nitrobenzaldehyde	65	—	06	—	+	—	
96	22	92	88	88	88	*p*-Nitrobenzoic acid	70	—	—	—	—	++	
92	63	92	84	82	26	2-Chloro-3,5-dinitrobenzoic acid	50	—	—	—	—	+	DN U.V.-03
91	10	84	81	72	40	Anthranilic acid	33	09	—	57	++	+	D3-08, DB-41
79	02	69	42	11	02	*m*-Aminobenzoic acid	33	10	—	—	++	+	D3-08, DB-42
85	02	77	42	27	05	*p*-Aminobenzoic acid	—	08	—	58	++	+	
88	92	87	87	76	63	*p*-Aminoacetophenone	—	07	06	—	+	—	DN U.V.-33
91	04	90	43	38	06	2-Chloro-4-aminobenzoic acid	—	07	—	59	+	+	
87	18	89	93	83	82	*o*-Toluic acid	—	—	—	—	—	+	
92	05	85	74	78	28	6-Amino-*o*-toluic acid	38	10	—	—	+	+	D1-08, DB-27
85	25	83	91	78	79	*m*-Toluic acid	—	—	—	—	—	+	
90	15	93	86	81	64	2-Amino-*m*-toluic acid	38	11	—	17	++	+	D1-06, D2-07 D3-64, DB-38 Mo-71
87	34	78	89	83	80	*p*-Toluic acid	—	—	—	—	—	+	
92	91	96	96	93	95	*p*-Tolualdehyde	—	—	03	—	+	—	DB-32
93	54	89	88	89	73	3,5-Dinitro-*p*-toluic acid	65	—	—	58	—	++	Mo-30
88	38	88	92	89	89	*p-tert.*-Butylbenzoic acid	—	10	—	—	—	+	
93	91	95	94	92	93	Cumaldehyde	—	—	13	—	+	—	

Most of the compounds listed in this Table gave no reaction with D1, D2, D3, DB and Mo reagents; for exceptions see Remarks.

At the bottom of Table XXII, several types of aliphatic carboxylic acids are presented. It is interesting to note the wide range of R_F values for solvents F and A, which does not occur when aromatic carboxylic acids are involved. This indicates that when acidic components are found at these R_F levels they very probably belong to an aliphatic series.

In Table XXIII (p. 371), a series is collected of those compounds that were available, in order to demonstrate the effect that *ortho* and *para* substitution in benzoic acid has on the R_F values and on the colour reactions. The decrease or increase of the R_F value when certain substituents are introduced followed the same principle, as demonstrated for dihydric phenols (see above). For instance reference may be made

References p. 373. *(Continued on p. 369)*

TABLE VIII

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME AROMATIC NON-PHENOLIC MONOCARBOXYLIC ACIDS WITH THE COOH GROUP IN THE SIDE CHAIN, AND THEIR DERIVATIVES

R_F values × 100						Compounds	Detection						Remarks
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D4*	*DN*	*Fe*	*Mn*	*Ind*	
92	92	95	94	92	92	Phenylacetic acid	—	—	—	—	—	+	
81	14	85	63	40	03	*dl*-Mandelic acid	—	—	—	+	+	++	
25	02	03	03	04	00	Benzilic acid	34	06	—	—	+	++	Mo-71
95	27	95	96	89	88	*trans*-Cinnamic acid	—	—	—	03	++	+	
91	12	88	91	84	85	Hydrocinnamic acid	—	—	—	—	—	+	
87	84	92	93	90	87	Cinnamic alcohol	—	—	—	—	+	—	
88	86	91	93	89	87	Cinnamaldehyde	—	—	06	—	+	—	Mo-+
92	16	92	92	84	00	*o*-Nitrocinnamic acid	65	—	—	—	+	+	
94	13	89	88	90	64	*p*-Nitrocinnamic acid	65	—	—	—	+	+	
94	93	89	92	93	90	*p*-Nitrocinnamic acid ethyl ester	65	—	—	—	+	—	
92	03	84	62	32	07	*p*-Aminocinnamic acid	38	06	—	—	+	+	D1-08
87	32	89	81	67	25	*dl*-Phenyllactic acid	—	07	—	51	+	++	
88	29	92	54	68	25	Phenylpyruvic acid	—	06	06	42	+	+	D1-17, D2-06 D3-22
87	14	90	73	65	23	*α*-(3-Indolyl)-acetic acid	—	07	—	—	++	+	D3-03, DB-58 17
92	15	92	83	72	42	*β*-(3-Indolyl)-propionic acid	—	08	—	—	+	+	D1U.V.-33
94	17	93	88	83	50	*γ*-(3-Indolyl)-butyric acid	—	08	—	—	+	+	D1U.V.-33

Most of the compounds listed in this Table gave no reaction with D1, D2, D3, DB and Mo reagents; for exceptions see Remarks.

TABLE IX

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME AROMATIC NON-HYDROXYLATED DI-, TRI- AND TETRACARBOXYLIC ACIDS AND THEIR DERIVATIVES

R_F values × 100						Compounds	Detection					Remarks
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*DN*	*Fe*	*Mn*	*Ind*	
81	00	62	38	08	00	Phthalic acid	—	—	—	—	+	
46	05	13	15	00	00	Hexahydrophthalic acid	—	—	—	—	+	
88	93	87	95	88	87	Phthalaldehyde	33	03	—	—	—	
82	02	78	44	19	02	Homophthalic acid	33	—	—	—	+	D1-06, D2-17 D3-17, DB-17
82	00	70	32	09	00	Phthalonic acid	33	+	03	+	++	
87	03	87	50	26	00	4-Chlorophthalic acid	34	—	—	—	++	
90	00	90	90	85	68	3-Nitrophthalic acid 1-monoethyl ester	13	—	—	—	++	
80	02	73	36	12	00	4-Nitrophthalic acid	65	—	—	—	++	Mo-71
86	03	70	12	15	00	3,5-Dinitrophthalic acid	65	—	—	—	++	
83	00	53	00	00	00	3-Aminophthalic acid	38	—	—	—	—	D4-09
84	79	29	01	00	00	4-Aminophthalic acid	71	—	—	—	—	D4-06
89	00	87	50	00	00	Isophthalic acid	—	—	—	—	+	
91	00	89	03	02	00	Terephthalic acid	—	—	—	—	+	
69	00	22	02	00	00	Hemimellitic acid	—	—	—	—	+	
91	00	71	04	01	00	Trimesic acid	—	—	—	—	+	
58	00	18	00	00	00	Pyromellitic acid	—	—	—	—	+	

Most of the compounds listed in this Table gave no reaction with D1, D2, D3, D4, DB and Mo reagents; for exceptions see Remarks.

TABLE X

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME AROMATIC AND HETEROCYCLIC AMINO ACIDS

R_F values × 100						Compounds	Detection										
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D1*	*D2*	*D3*	*D4*	*DB*	*NH**	*Fe*	*Mo*	*Mn*	*Ind*
28	00	00	00	00	00	L-Tyrosine	—	08	60	64	63	—	24	—	71	+	—
39	00	00	00	00	00	Monochloro-L-tyrosine	—	—	—	—	60	—	24	—	—	++	—
16	00	00	00	00	00	DL-*o*-Tyrosine	34	—	57	13	09	35	64	—	—	++	—
12	00	00	00	00	00	DL-*m*-Tyrosine	34	—	08	12	09	33	65	—	—	++	—
53	01	01	00	00	00	3,5-Diiodotyrosine	—	17	—	—	07| 23|	—	24	—	—	++	—
26	04	00	00	00	00	DL-Phenylalanine	34	—	—	—	06	—	24	—		—	—	—
08	01	00	00	00	00	DL-3,4-Dihydroxyphenylalanine	—	06	06	06	61	28	24	42	03	++	—
06	00	00	00	00	00	DL-Proline	—	72	72	72	02	56	06	—	—	+	—
03	00	00	00	00	00	DL-4-Hydroxyproline	—	72	72	72	02	56	09	—	—	+	—
47	00	07	09	01	00	2,2′-Pyrrolidonecarboxylic acid	—	—	—	—	—	—	22	—	—	—	++
36	03	00	00	00	00	L-Tryptophan	—	—	—	—	06	—	24	—	—	+	—
72	11	62	86	48	42	Quinaldic acid	33	—	—	—	—	—	—	03	—	+	++
61	03	09	02	00	00	Kynurenic acid	40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
35	01	08	28	04	02	Picolinic acid	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+
67	00	31	56	05	01	Nicotinic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++
24	00	01	00	00	00	Chelidamic acid	—	—	—	—	—	—	—	03	—	—	++
62	00	09	00	00	00	Citrazinic acid	44	10	14	22	63	25	—	—	71	—	+

* NH = ninhydrin reagent.
DN reagent gave no reaction with the compounds listed in this Table.

TABLE XI

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME BIOLOGICALLY ACTIVE NITROGEN COMPOUNDS

R_F values × 100						Compounds	Detection										
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D1*	*D2*	*D3*	*D4*	*DB*	*DN*	*Fe*	*Mo*	*Mn*	*Ind*
36	85	00	03	00	00	Ephedrine	—	—	—	60	08	—	—	—	—	+	—
28	73	00	00	00	00	Tyramine	33	12	57	10	06	—	—	—	—	++	—
23	00	00	00	00	00	Adrenaline	—	13	63	65	66	24	—	42	26	+	—
14	00	00	00	00	00	Noradrenaline	—	12	14	14	55	25| 69|	—	50	28	+	—
92	90	94	93	94	92	Indole	—	06	—	—	10	25	15	—	—	+	—
53	84	01	09	00	01	Gramine	—	—	07	07	11	24	—	—	03	+	—
38	64	00	00	00	00	Serotonine	65	20	24	25	63	35	—	70	28	+	—
92	00	91	84	67	28	Isatin	65	07	08	60	—	—	03	—	—	+	—
24	16	00	01	00	00	Pyridoxine	32	09	24	25	12	35	—	64	71	++	—
16	53	05	31	00	00	Imidazole	—	—	08	12	07	+	—	59	03	+	—
47	00	08	02	01	00	Barbituric acid	34	03	13	15	07	+	—	62	—	++	++
33	02	02	00	00	00	Alloxantin	33	—	—	—	—	—	—	—	71	—	+
08	00	00	00	00	00	Uric acid	—	—	—	—	08	12	—	—	28	—	—
25	12	04	01	00	00	Uracil	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
25	14	02	08	00	00	Dehydrouracil	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—

TABLE XII

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME COUMARIN DERIVATIVES

R_F values × 100						Compounds	Detection										
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D1*	*D2*	*D3*	*D4*	*DB*	*DN*	*Fe*	*Mo*	*Mn*	*Ind*
96	87	84	91	87	89	Coumarin	—	—	—	—	—	—	—	—	03	++	—
93	84	92	97	94	92	3,3-Methylene-bis-4-hydroxycoumarin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
87	62	84	85	73	18	Umbelliferone	44	07	17	64	64	43	—	—	—	+	—
88	66	93	92	76	26	3-Methyl-umbelliferone	44	01	13	65	10	71	—	—	—	+	—
87	63	88	87	72	18	4-Methyl-umbelliferone	33	09	15	21	—	56	—	—	—	+	—
86	62	88	87	73	17	4-Methyl-7-acetoxycoumarin	33	—	—	58	—	—	—	—	—	—	—
87	64	89	88	76	25	4-Methyl-6-acetyl-7-hydroxycoumarin	38	08	57	13	58	70	—	09	—	+	—
89	69	90	90	92	92	4-Methyl-7-hydroxy-8-acetylcoumarin	05	05	—	58	—	03	—	—	01	—	—
90	13	85	85	61	08	4-Hydroxycoumarin	34	06	19	21	08	—	—	—	—	+	—
33	01	03	01	00	00	Esculetin	38	—	—	—	61	51	—	—	—	+	—
81	23	77	53	12	00	4-Methylesculetin	01	02	06	07	64	51	—	45	01	+	—
69	66	55	35	45	39	4,5,7-Trihydroxycoumarin-6-carboxylic acid ethyl ester	32	09	64	65	07	69	—	61	30	+	—

TABLE XIII

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME 1,2- AND 1,4-PYRONE DERIVATIVES

R_F values × 100						Compounds	Detection										
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D1*	*D2*	*D3*	*D4*	*DB*	*DN*	*Fe*	*Mo*	*Mn*	*Ind*
84	13	97	97	93	93	Dehydroacetic acid	—	—	—	—	—	—	—	03	—	+	+
87	10	81	77	58	14	Isodehydroacetic acid	—	—	—	65	—	—	—	—	—	+	+
73	49	48	39	75	56	Dehydroacetic-5-carboxylic acid	—	—	63	64	+	—	—	63	71	+	+
77	03	87	83	23	01	Triacetic acid lactone	—	—	—	09	01	69	—	+	—	+	+
51	05	22	16	02	01	Kojic acid	40	08	22	25	11	68	—	65	42	+	—
83	00	78	70	46	13	Patulin	34	08	64	63	03	—	—	—	—	++	—
91	00	83	90	00	00	Coumalic acid	48	—	08	17	+	—	—	—	—	+	+
16	00	03	00	00	00	Chelidonic acid	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	++
95	96	92	95	91	93	Chelidonic acid diethylester	—	—	57	60	+	—	—	—	—	++	—
07	00	03	00	00	00	Meconic acid	34	58	—	24	17	—	—	64	—	++	++

TABLE XIV

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME NATURALLY OCCURRING TROPOLONES

R_F values × 100						Compounds	Detection										
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D1*	*D2*	*D3*	*D4*	*DB*	*DN*	*Fe*	*Mo*	*Mn*	*Ind*
96	93	94	97	93	93	α-Thujaplicin	65	11	—	64	15	—	52	51	—	+	+
97	93	93	97	93	94	β-Thujaplicin	65	12	—	65	65	—	—	62 / 49	—	++	++
92	92	90	97	95	89	γ-Thujaplicin	65	—	—	—	23	—	—	—	—	+	—
93	91	92	97	95	90	Nootkatin	65	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
94	32	94	96	92	92	Thujic acid	39	—	—	—	—	—	—	03	—	+	—
63	00	38	05	02	00	Puberulic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
34	02	06	02	02	00	Puberulonic acid	15	58	—	—	08	—	07	53	03	+	—
84	00	50	07	03	00	Stipitatic acid	38	12	65	65	11	—	—	52	—	+	+

TABLE XV

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME NATURAL PRODUCTS OF VEGETABLE ORIGIN

R_F values × 100						Compounds	Detection										
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D1*	*D2*	*D3*	*D4*	*DB*	*DN*	*Fe*	*Mo*	*Mn*	*Ind*
90	85	91	78	79	27	Pinosylvin	33	10	65	23	12	69	02	—	71	+	—
95	91	92	95	90	90	Pinosylvin monomethyl ether	—	08	65	23	12	38	02	—	—	++	—
90	87	95	92	90	77	*a*-Conidendrin	34	62	60	56	56	—	—	—	30	++	—
90	88	95	93	89	79	*β*-Conidendrin	39	62	62	56	60	34	—	—	34	+	—
89	88	91	96	87	78	Matairesinol	—	13	62	61	65	32	02	—	30	++	—
88	86	89	97	86	79	Pinoresinol	—	12	62	61	65	35	02	—	30	++	—
92	91	95	72	74	12	Nordihydroguaiaretic acid	—	14	23	25	64	29	55	51	30 57	++	+
74	51	42	00	00	00	Haematoxylin	65	07	28	29	12	25 64	17	66 25	54 28	67	—
89	68	93	87	71	46	Curcumin	10	—	64	64	59	54	—	64	62 23	++	—
68	01	13	00	00	00	Chlorogenic acid	34	03	56	07	07	42	—	42	32	+	+
56	02	09	00	00	00	Ellagic acid	70	—	57	57	56	56	—	71	69	+	+
95	93	92	29	40	00	Phloretin	13	09	23	65	12	66	—	23	28	++	—
73	23	54	00	00	00	Phlorizin	—	09	23	65	12	66	—	24	28	++	—
93	12	92	80	76	19	Hesperetin	—	03	13	64	08	28	—	—	—	+	—
01	03	00	00	00	00	Hesperidin	—	03	13	64	08	28	—	—	—	+	—
45	02	08	05	00	00	Hesperidin methyl chalcone	48	58	62	64	08	50	—	56	39	+	—
32	00	00	00	00	00	Rutin	65	06	65	64	11	48	—	50	07 69	+	—
92	14	91	05	04	00	Quercetin	48	06	63	64	11	48	—	50	03 43	+	—
94	21	90	05	09	00	Morin	10	60	65	66	11	03	—	51	51	++	—
90	00	38	00	00	00	*m*-Digallic acid	—	—	19	17	08	03	—	68	03	++	+
97	18	93	89	82	25	Cetraric acid	13	17 24	—	18	07	—	+	24	34	+	+
95	67	93	88	73	00	Gyrophoric acid	—	08	22	24	09	25	+	—	71	+	+

TABLE XVI

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF MISCELLANEOUS COMPOUNDS

R_F values × 100						Compounds	Detection										
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D1*	*D2*	*D3*	*D4*	*DB*	*DN*	*Fe*	*Mo*	*Mn*	*Ind*
93	04	91	91	86	51	3,5-Dihydroxy-2-carbethoxy-4-carboxyphenylacetic acid ethyl ester	33	07	19	23	10	25	—	17	71	—	+
94	85	93	94	92	92	3,5-Dihydroxy-2,4-dicarbethoxy-phenylacetic acid ethyl ester	33	07	15	22	09	25	—	—	71	—	—
93	02	96	17	24	00	Aurintricarboxylic acid	65	—	—	—	—	55	—	24	66 71	67	++

TABLE XVII

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME METABOLIC PRODUCTS FROM MOULDS AND *Penicillium* SPECIES

R_F values × 100						Compounds	Detection										
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D1*	*D2*	*D3*	*D4*	*DB*	*DN*	*Fe*	*Mo*	*Mn*	*Ind*
94	05	78	57	23	07	γ-Methyltetronic acid	—	01	10	12	08	21	—	64	—	+	+
87	23	70	40	35	03	α-Bromo-γ-methyltetronic acid	33	01	15	20	08	22	—	65	—	+	+
27	00	03	03	02	00	Carolinic acid	—	02	—	—	—	—	—	07	—	+	+
54	16	31	71	39	37	Carolic acid	—	—	—	—	—	—	03	07	—	+	+
08	00	03	04	00	00	Dehydrocarolic acid	—	—	—	—	—	—	—	07	—	+	+
33	00	08	17	02	00	Carlic acid	—	02	—	—	—	—	—	06	—	+	+
52	03	19	10	10	02	Carlosic acid	—	—	—	—	—	—	—	07	—	+	+
87	47	84	98	88	87	Terrestric acid	—	06	—	17	—	—	—	06	—	+ +	+
88	85	90	85	71	41	Penicillic acid	—	—	+	+	—	—	—	—	—	+ +	+
28	00	00	00	00	00	Ascorbic acid	—	—	05	05	—	—	+	72	30	+	+
25	01	00	00	00	00	Dehydroascorbic acid	71	—	—	—	12	—	—	—	—	+	—
68	69	42	52	06	01	Terrein	65	—	—	—	—	57	05	—	—	+ +	—
51	05	22	16	02	01	Kojic acid	40	08	22	25	11	68	—	65	42	+	—
81	49	67	80	68	61	Maltol	—	—	—	—	03	—	—	24	71	+ +	—
83	00	78	70	46	13	Patulin	34	08	64	63	03	—	—	—	—	+ +	—
79	00	77	38	65	45	Spinulosin	65	—	—	64	06	—	—	53	—	+	—
75	02	58	03	02	00	Gentisic alcohol	34	52	56	52	51	70	—	+	42 / 30	+ +	—
97	97	95	82	80	42	Gentisic aldehyde	33	—	—	—	60	70	07	28	30	+	—
88	36	82	19	25	00	Gentisic acid	38	—	—	—	60	70	—	28	68	+	+
88	62	78	90	85	68	6-Methylsalicylic acid	33	08	08	62	09	35	—	23	—	+	+
89	85	90	35	42	05	Toluhydroquinone	—	56	—	—	56	—	—	—	71	+	—
79	00	54	02	00	00	3,5-Dihydroxyphthalic acid	33	07	—	21	10	27	—	65	—	+	+
78	00	62	05	00	00	3,5-Dihydroxy-6-methoxyphthalic acid	33	07	—	19	09	25	—	25 / 65	01	+ +	+
94	90	91	38	43	05	Orcinol	34	07	15	65	12	26	—	—	68	+	—
93	28	93	47	52	02	Orsellinic acid	—	11	14	22	08	25	—	24	—	+ +	+
34	00	14	03	00	00	*cis*-Ethylene oxide dicarboxylic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	24	+
83	00	60	08	05	00	3-Hydroxyphthalic acid	32	—	—	57	09	35	—	24	—	+	+
84	26	78	10	03	01	$C_{10}H_{10}O_6$-acid	34	—	—	21	10	27	—	65	—	+ +	+
88	46	85	28	18	00	$C_{10}H_{10}O_7$-acid	71	58	—	18	59	26 / 70	04	65	01	+ +	+
83	22	78	13	03	00	Ustic acid	33	—	—	21	10	26 / 52	—	25 / 65	33	+ +	+
85	36	79	26	11	00	Dehydroustic acid	65	17 / 58	—	17	10	—	—	25	—	+ +	+
80	04	82	90	25	03	Cyclopolic acid	—	—	—	17	+	—	05	—	—	+	+
91	02	89	93	91	57	Cyclopaldic acid	34	—	—	—	—	—	+	61	—	+	—
89	00	84	35	27	04	3,5,6-Trihydroxy-4-methyl-phthal-aldehyde	65	—	—	—	—	—	08	51	71	+	—
91	17	89	93	92	80	Mycophenolic acid	—	—	—	—	—	—	—	25	—	+ +	+
93	90	88	92	89	82	*d*-Usnic acid	24	—	—	—	08	—	—	58	—	—	+
93	20	92	93	79	23	Erdin	65	—	—	—	—	33	—	70	—	+ +	+
92	91	90	96	95	92	Geodin	65	69	—	—	—	—	—	—	01	+ +	+
86	85	81	93	89	84	Griseofulvin	39	07	—	17 / 24	—	—	—	71	26	+ +	—
63	00	38	05	02	00	Puberulic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
34	02	06	02	02	00	Puberulonic acid	15	58	—	—	08	—	07	53	03	+	+
84	00	50	07	03	00	Stipitatic acid	38	12	65	65	11	—	—	52	—	+	+

TABLE XVIII

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME UNSATURATED ALIPHATIC MONO-, DI- AND TRICARBOXYLIC ACIDS

R_F values × 100						Compounds	Detection			Remarks
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*Fe*	*Mn*	*Ind*	
90	06	87	84	73	35	Acrylic acid	—	++	++	
93	05	87	88	93	94	Crotonic acid	—	++	+	
89	13	90	88	84	83	Tiglic acid	—	++	+	
91	08	93	89	92	70	β,β'-Dimethylacrylic acid	—	++	+	
92	15	91	91	93	00	Sorbic acid	—	++	+	
70	00	46	18	02	00	Maleic acid	58	++	++	
85	00	68	16	00	00	Fumaric acid	60	++	++	
82	08	74	18	07	00	Acetylenedicarboxylic acid	—	++	++	
92	00	86	31	13	00	Mesaconic acid	—	++	++	
79	00	59	23	03	00	Itaconic acid	18	+	+	DB-70
71	01	46	25	03	00	Citraconic acid	57	++	++	
79	00	58	19	02	00	Glutaconic acid	18	++	++	
78	00	51	02	00	00	*trans*-Aconitic acid	—	++	++	D1-D4 +, Mo-71
85	00	44	01	00	00	*cis*-Aconitic acid	—	++	++	
90	00	75	23	00	00	Muconic acid	—	+	+	
69	00	22	01	00	00	Tricarballylic acid	—	—	++	

Most of the compounds listed in this Table gave no reaction with the following reagents: U.V., D1, D2, D3, D4, DB, DN and Mo; for exceptions see Remarks.

TABLE XIX

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME ALIPHATIC DICARBOXYLIC ACIDS AND CORRESPONDING METHYL DERIVATIVES

R_F values × 100						Compounds	Detection	
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*Mn*	*Ind*
66	00	30	04	00	00	Oxalic acid	+	++
69	03	32	08	01	00	Malonic acid	—	++
72	07	39	14	01	00	Succinic acid	—	+
78	07	57	34	03	00	Glutaric acid	—	+
79	08	67	55	04	01	Adipic acid	—	+
84	00	71	76	27	02	Pimelic acid	—	+
92	00	88	79	38	01	Suberic acid	—	+
88	00	88	79	68	02	Azelaic acid	—	+
76	00	50	12	03	00	Methylmalonic acid	—	++
81	00	68	28	13	00	Dimethylmalonic acid	—	++
82	00	67	22	05	00	α-Methylsuccinic acid	—	+
86	01	79	41	13	00	α-Dimethylsuccinic acid	—	+
74	02	70	12	00	00	Tetrafluorosuccinic acid	—	+
90	00	80	41	11	00	α-Methylglutaric acid	—	+
85	00	76	38	09	00	β-Methylglutaric acid	—	+
93	06	85	83	77	00	*d*-Camphoric acid	—	+
92	06	62	93	94	92	Pinonic acid	—	+
94	00	84	74	46	07	Pinic acid	—	+

The compounds listed in this Table gave no reaction with the following reagents: U.V., D1, D2, D3, D4, DB, DN, Fe and Mo.

TABLE XX

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME ALIPHATIC HYDROXY ACIDS

R_F values × 100						Compounds	Detection			Remarks
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*Fe*	*Mn*	*Ind*	
51	01	14	06	00	00	Glycolic acid	—	+	++	
68	00	35	15	04	00	Lactic acid	—	+	++	
13	00	00	00	00	00	Hydracrylic acid	—	+	++	
35	00	03	00	00	00	Glyceric acid	—	++	++	
52	02	10	01	00	00	Tartronic acid	+	++	++	
48	00	07	02	00	00	DL-Malic acid	c3	+	++	D3 +
32	00	02	00	00	00	DL-Tartaric acid	44	+	++	
47	00	06	00	00	00	Dihydroxytartaric acid	58	+	++	
48	03	05	00	00	00	Citric acid	03	+	++	
40	00	03	00	00	00	Isocitric acid	—	—	+	
05	00	00	00	00	00	Mucic acid	—	+	+	
05	00	00	00	00	00	D-Galacturonic acid	—	+	+	
07	00	02	00	00	00	D-Glucuronic acid	—	+	+	
27	00	01	01	00	00	D-Glucuronic acid lactone	—	+	—	
05	00	00	00	00	00	D-Gluconic acid	03	+	++	D1-7, D2-17, Mo-30
28	00	01	00	00	00	D-Gluconic acid-δ-lactone	—	+	—	
71	03	32	19	01	00	2-Oxogulonic acid	—	+	+	

Most of the compounds listed in this Table gave no reaction with the following reagents: U.V., D1, D2, D3, D4, DB, DN and Mo; for exceptions see Remarks.

TABLE XXI

PAPER-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SOME ALIPHATIC KETO ACIDS AND OTHER KETO AND HYDROXY COMPOUNDS

R_F values × 100						Compounds	Detection										
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D1*	*D2*	*D3*	*D4*	*DB*	*DN*	*Fe*	*Mo*	*Mn*	*Ind*
92	35	87	93	77	46	Pyruvic acid	—	08	62	24| 64|	09	—	03	17	71	+	++
83	00	64	00	00	00	α-Ketobutyric acid	—	—	07	65| 60|	02	—	03	71	71	++	++
65	00	31	08	00	00	α-Ketoglutaric acid	—	—	07| 62|	65	01	—	03	60	—	+	++
79	01	44	04	00	00	β-Ketoglutaric acid	—	07	65	56	60	—	+	63	71	++	++
76	00	45	13	01	00	γ-Ketopimelic acid	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	++
78	04	62	71	29	09	Laevulinic acid	—	—	+	+	—	—	03	—	—	—	+
23	00	00	00	00	00	Mesoxalic acid	34	—	—	—	—	—	+	03	—	+	++
42	03	03	02	00	00	Oxalacetic acid	34	07	24| 64|	15| 25|	09	—	+	60	71	+	++
97	85	95	95	90	75	Ketipic acid monoethyl ester	34	—	—	62	62	—	+	13	71	—	+
94	88	93	94	92	90	Ketipic acid diethyl ester	33	17	68	55	08	—	+	64	71	++	++
92	93	96	92	93	95	Parasorbic acid	34	—	13	21	—	—	—	—	—	+	—
48	00	11	01	00	00	*trans*-Aconitic acid anhydride	47	—	52	20	07	—	—	—	—	++	++
Miscellaneous keto and hydroxy compounds																	
95	29	33	28	01	00	1,3-Dihydroxyacetone	—	—	—	—	—	—	05	—	71	+	—
85	82	82	93	80	66	Diacetyl	—	06	64	64	—	—	06	—	30	+	—
85	08	91	84	66	20	Acetoin	—	03	+	—	—	18	06	—	—	+	—
77	70	49	73	23	06	Acetaldol	—	—	66	65	—	—	06	—	—	+	—

to the great differences in R_F shown by compounds with nitro-, amino- and hydroxy-groups, in the case of solvents B, C and D. The differences in effect occurring in solvent E are not so marked except when an additional hydroxy-group is present.

In Table XXIII, five examples are also given of salicylic acid derivatives with different substituents at position 5. The variations in R_F values followed the general rule as described previously for dihydric phenols. Colour reactions in U.V. and with ferric chloride were observed throughout, but the shades were slightly different. Of these compounds, 5-aminosalicylic acid was the most reactive, whereas 5-hydroxy-salicylic acid showed a typical hydroquinone colour pattern.

In Table XXIV (p. 371), three typical colour-reaction sequences are presented, which may serve as a guide when determining, with colour reactions only, whether a substance is a pyrocatechol, resorcinol or hydroquinone derivative. As far as the examples from the reference system are concerned, these colour patterns were fairly constant and were not influenced by additional substituents. An additional hydroxy group forms an exception, since it gives colour patterns identical to those of trihydric phenols.

Naphthols show intense colour patterns of the type indicated. Their reactions with DB and Fe are also strong, although the colour varies; this has, however, not been indicated in the Table. It was striking how easily the aliphatic keto acids reacted with diazonium reagents. However, the colours were more or less equal in shade, and it was difficult to discern any distinct differences, except with ferric chloride.

Four stabilized diazonium reagents were chosen from commercial sources. During the testing of several diazonium reagents (some of which are described in the section *Additional reagents*) it was observed that many of them failed to react under standard conditions, the principle of which is that diazo coupling occurs when the *para* or *ortho* position in a phenolic structure is free. Other reagents gave fairly specific colours with certain types of compounds. As can be seen from the Tables, the choice of at least 4 different diazonium reagents is justified, since in many cases only one reagent gives a positive reaction. Phenols substituted in the *meta* position are in all cases favoured. Coupling occurred even if the hydroxyl group was etherified. Pyrones, pyridoxine, barbituric acid and aliphatic keto acids are some of the non-phenolic compounds that undergo diazo-coupling.

2,6-Dibromoquinone-4-chloroimide is known to be a typical phenolic reagent, coupling predominantly with phenols with a free *para* position. With a few exceptions, reaction also occurred when the group in the *para* position could be decarboxylated or oxidized into a volatile aldehyde[18]. Some examples of other types of coupling compounds are *o*- and *m*-aminobenzoic and -toluic acids, indole, pyridoxine, and kojic acid. Very rarely a red colour was produced, for instance with γ-methyltetronic acid, thiosalicylic acid and uric acid.

2,4-Dinitrophenylhydrazine was used for detecting aldehyde and keto compounds. Some examples of other compounds giving positive reactions are haematoxylin, α-thujaplicin, indole, pyrogallol and pyrocatechol.

The colour reactions of ferric chloride with phenolic compounds are usually

References p. 373.

described as rather unspecific. However, most pyrocatechol derivatives gave green colours. Many *meta*-substituted phenols of resorcinol type failed to give colours. This was even the case with simple monohydric phenols, probably due to the low concentration level used. Some examples of non-aromatic compounds with a positive reaction are tetronic acids and some aliphatic acids, which gave yellow colours.

TABLE XXII

A COMPREHENSIVE LIST OF TYPES OF COMPOUNDS INVESTIGATED, WITH THEIR APPROXIMATE R_F VALUES (± 10) IN SIX DIFFERENT SOLVENT SYSTEMS

Approx. range of R_F values × 100						*Types of compounds*
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*	
						Monohydric phenols
90	90	90	90	90	90	+ alkyl or OCH_3 or Cl
50	80	50	30	10	00	+ NH_2
90	70	90	90	90	70	+ 1-2 NO_2
90	70	90	30	50	70	+ 3 NO_2
90	90	90	70	70	40	+ CH_2OH
90	80	90	90	80	60	+ $COCH_3$
90	90	90	90	90	60	+ CHO
90	10	90	40	30	00	+ COOH
90	90	90	90	90	70	+ COOR
40	20	10	00	00	00	+ COOH + NH_2
80	10	60	20	30	00	+ COOH + NO_2
90	60	90	90	90	70	+ COOH + CH_3
						Dihydric phenols
90	90	90	60	60	10	1,2
90	90	90	30	30	00	1,3
90	90	90	20	20	00	1,4
80	10–30	80	10–30	10–30	00	1,2 + COOH
80	10–70	70	10	10–20	00	1,3 + COOH
80	40	80	20	20	00	1,4 + COOH
80	00	60	00	00	00	1,2 + 2 COOH
80	00	50	00	00	00	1,3 + 2 COOH
60	00	20	00	00	00	1,4 + 2 COOH
80	00–60	60	00	00	00	*Trihydric phenols*
70	00	40–80	00	00	00	+ COOH
90	90	90	50	50–70	10	*Dihydric naphthols*
						Benzoic acid derivs.
90	00	80	50–70	20–60	10–30	+ NH_2
90	25	80	90	90	80	+ CH_3
90	20–40	90	90	90	40–80	+ NO_2
80	00	30–80	10–40	00	00	+ 2–3 COOH
20–60	10	10–50	00–50	10	00	*Aromatic and heterocyclic amino acids*
20–50	10–80	10	00	00	00	*Biogenic amines*
90	20–80	80	80	70	30	*Coumarins*
80	10–50	10–90	10–90	10–80	10–80	*Pyrones*
90	90	90	90	90	90	*Tropolones*
40–80	10–40	10–40	10	00	00	+ COOH
20–90	10–40	10–70	10–70	10–40	10–40	*Tetronic acids*
						Aliphatic carboxylic acids
90	10	90	80	80	40–90	Monocarboxylic acids, unsaturated
80	00	60	20	10	00	Dicarboxylic acids, unsaturated
70–80	10	40–80	10–70	10–60	00	Dicarboxylic acids, saturated
10–60	00	10–30	10	00	00	Hydroxy acids
30–80	10–30	10–90	10–80	10–70	00–40	Keto acids

References p. 373.

TABLE XXIII

THE INFLUENCE OF SUBSTITUENTS ON R_F VALUES AND COLOUR REACTIONS

1. A few examples are given of compounds 5-X-salicylic acid, where X designates the chloro-, methyl-, hydroxy-, carboxyl- and amino-group.

2. A few examples are given of compounds *ortho*-Y-benzoic acid, where Y designates the chloro-, methyl-, hydroxy-, amino-, thio-, nitro- and carboxyl-group.

3. A few examples are given of compounds *para*-Z-benzoic acid, where Z designates the chloro-, nitro-, methyl-, amino-, hydroxy- and carboxyl-group.

The influence of these substituents on the R_F values as well as on the characteristics of the colour reactions is clearly demonstrated.

R_F values × 100						Compounds	Detection									
F	*E*	*A*	*B*	*C*	*D*		*U.V.*	*D1*	*D2*	*D3*	*D4*	*DB*	*DN*	*Fe*	*Mo*	*Mn*	*Ind*
94	67	86	87	85	70	5-Chlorosalicylic acid	33	—	—	—	08	—	—	25	—	+	+
91	46	89	90	89	65	5-Methylsalicylic acid	38	—	—	—	—	—	—	25	—	+	+
88	36	82	19	25	00	5-Hydroxysalicylic acid	38	72	—	—	58	70	—	28	68	+	+
86	02	92	24	13	00	5-Carboxysalicylic acid	30	—	—	—	—	—	—	65	—	—	+
41	21	09	00	00	00	5-Aminosalicylic acid	48	—	62	64	08	53	—	65	68	++	+
88	28	85	88	86	80	*o*-Chlorobenzoic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++
87	18	89	93	83	82	*o*-Methylbenzoic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
92	51	92	87	86	52	*o*-Hydroxybenzoic acid	33	06	—	—	07	—	—	24	—	+	+
91	10	84	81	72	40	*o*-Aminobenzoic acid	33	—	—	08	09	41	—	57	—	++	+
92	11	92	78	88	33	*o*-Thiobenzoic acid	33	01	07	07	08	21	—	58	30	++	+
96	16	88	90	80	29	*o*-Nitrobenzoic acid	70	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
81	00	62	38	08	00	*o*-Carboxybenzoic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
94	37	91	92	89	92	*p*-Chlorobenzoic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
96	22	92	88	88	88	*p*-Nitrobenzoic acid	70	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++
87	34	78	89	83	80	*p*-Methylbenzoic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
85	02	77	42	27	05	*p*-Aminobenzoic acid	—	—	—	—	08	—	—	58	—	++	+
88	08	91	37	28	01	*p*-Hydroxybenzoic acid	—	06	—	58	07	—	—	03	—	+	+
91	00	89	03	02	00	*p*-Carboxybenzoic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+

TABLE XXIV

A LIST OF SOME TYPICAL COLOUR-REACTION SEQUENCES THAT ARE INDEPENDENT OF FURTHER SUBSTITUENTS

Few exceptions have so far been observed. (The code numbers have been given with a good approximation.)

Type of compounds	Detection										
	U.V.	*D1*	*D2*	*D3*	*D4*	*DB*	*DN*	*Fe*	*Mo*	*Mn*	*Ind*
Pyrocatechol derivatives		07	10	21	10	35		42		+	
		07	—	—	10	35		42		+	
Resorcinol derivatives		06	15	21	10	65		—		+	
		06	15	21	10	25		25		+	
Hydroquinone derivatives		72	—	—	72	53		—		+	
		72	72	72	72	69		28		+	
Naphthol derivatives		12	25	25	12	+		+		+	
Coumarin derivatives	33	+	+	+	+	51				+	
	44	+	+	+	+	71				+	
Benzoic acid, chloro- and methyl-derivatives only	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Tetronic acids		—	—	—	—			07		+	+
Aliphatic keto acids		07	62	64	09	—	03	60	71	+	+

References p. 373.

Phosphomolybdic acid has been shown to give many colour shades, which were difficult to interpret.

Most compounds gave positive reactions with permanganate. Fully methylated phenols and methyl- and chloro-derivatives of benzoic acid, however, gave a negative reaction. The indicator reagent was specific for detecting carboxyl groups. The colour in U.V. of a non-sprayed compound was recorded. Since it was nonspecific, it was hard to interpret. Examination of the sprayed areas in U.V. yielded further data, but these have not been recorded in this paper.

On comparing the data for an unknown compound with the data of the R_F values presented as a diagram in the reference system in the order F, E, A, B, C and D, it was possible visually to establish its probable type and to exclude several other types as not probable. The identity of six R_F values with those of an unknown compound was not regarded as significant, unless several colour reactions were found to agree. This provided strong evidence for the identity of a certain type of compound, even before it had been isolated. This information facilitates, in some cases, the chemical isolation procedure or the choice of the preparative chromatographic method.

In view of these possibilities, the reference system was provided with several cross-indexing systems.

The inclusion of many natural products of vegetable origin indicates further possibilities of investigation in this field.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is greatly indebted to Prof. G. EHRENSVÄRD, head of the Department, who suggested this work, for his encouragement and financial support and for valuable suggestions and discussions.

His thanks are due to Dr. G. HÖGSTRÖM for permission to use the solvent systems that he has devised, and to Dr. S. LYBING for valuable collaboration in classifying the compounds studied.

For numerous samples of compounds belonging to mould species, the author owes much gratitude to Prof. H. RAISTRICK of the London School of Tropical Medicine, London, to Dr. J. GIERER of the Swedish Wood Research Laboratory, Stockholm, and to Dr. M. NILSSON of the Royal Institute of Technology, Stockholm, who generously put samples of the vanilline–lignin series and pinosylvin–thujaplicin series at his disposal. Drs. G. WIDMARK and T. HULTIN of the University of Stockholm, and E. BLADH, of the University of Lund, have also kindly contributed to the collection of compounds.

SUMMARY

A paper-chromatographic procedure is described for the identification of phenol derivatives, metabolic products from moulds, especially from *Penicillia* species, and aliphatic compounds of biochemical interest. Information is given concerning the application of the method to the characterization of unknown substances encountered in various biological investigations, mg quantities of material being sufficient. The R_F values in six different solvent systems together with the corresponding colour reactions produced by ten standard reagents have been collected and presented in 21 Tables. In all, approx. 450 compounds were investigated.

References p. 373.

Original recordings were made on standard cards, which made it possible to present the R_F values as diagrams and to give the code of colour reactions for each compound separately. A standard numerical colour index was used for these colour recordings.

The possible application of this procedure, within the biochemical, microbiological, medical and organic-chemical fields, to preliminary investigations of unknown mixtures is indicated.

A special set-up was constructed for rapid analysis by means of which spraying as well as evaluation of six chromatograms could be carried out simultaneously.

Two new stable diazonium reagents, *o*-dianisidine diazotate and 4-benzoylamino-2,5-dimethoxy-aniline, were found to be useful for detecting phenolic compounds and aliphatic keto acids. Several other reagents were tested with regard to their usefulness for spraying purposes in paper-chromatographic analysis.

REFERENCES

1 J. H. BIRKINSHAW, *Ann. Rev. Biochem.*, 22 (1953) 371.
2 A. BRACKEN, *The Chemistry of Micro-organisms*, Pitman & Sons, London, 1955.
3 C. E. STICKINGS AND H. RAISTRICK, *Ann. Rev. Biochem.*, 25 (1956) 225.
4 G. EHRENSVÄRD, *Exptl. Cell Research*, Suppl. 3 (1955) 102.
5 G. EHRENSVÄRD *et al.*, to be published.
6 S. GATENBECK, *Acta Chem. Scand.*, 11 (1957) 555.
7 L. REIO, to be published.
8 S. LYBING AND B. E. HAGSTRÖM, *Exptl. Cell Research*, 13 (1957) 60.
9 F. SMITH AND D. SPRIESTERSBACH, *Nature*, 174 (1954) 466.
10 P. HEINRICH AND W. SCHULER, *Helv. Chim. Acta*, 30 (1947) 886.
11 MAY & BAKER LTD., *Laboratory Bulletin*, 2, No. 1 (1956) 9.
12 C. A. WACHTMEISTER, *Acta Chem. Scand.*, 6 (1952) 818.
13 F. FEIGL, *Spot Tests in Organic Analysis*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1956, p. 213.
14 P. GODIN, *Chem. & Ind.* (London), (1954) 1424.
15 R. CARVEN, *J. Chem. Soc.*, (1931) 1605.
16 E. LEDERER AND M. LEDERER, *Chromatography*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1957.
17 G. HÖGSTRÖM, personal communication.
18 J. GIERER, *Acta Chem. Scand.*, 8 (1954) 1319.

Received January 13th, 1958

PAPER CHROMATOGRAPHY AND PAPER ELECTROPHORESIS OF PHENOLS AND GLYCOSIDES

C. B. COULSON AND W. C. EVANS

Department of Agricultural Chemistry, University College of North Wales, Bangor (Great Britain)

Although some solvent systems have been reported for the paper chromatography of various phenolic substances[1], the two reported here are valuable alternatives.

PAPER CHROMATOGRAPHY

Solvent systems

Whatman No. 4 paper used; temperature of chromatography room, 20° ± 1°.

(a) Benzene–glacial acetic acid–water, (20:5:just saturated)[2], used for ascending chromatography, gave results within 8 h.

(b) *n*-Butanol–ethanol–borate buffer[3] (9.54 g/l sodium tetraborate), (1:1:1) was used for ascending chromatography, with paper impregnated with the borate buffer which was dried before use. Adequate separation is obtained in 18 h. WACHTMEISTER[4] has used a related solvent system.

2,5-Dihydroxyphenolic substances tend to streak in borate buffers, when used both for paper chromatography and electrophoresis.

Detection reagents

(a) A spray application of the EVANS' quantitative *o*-dihydroxyphenol colour reaction[5] proved useful for detection of catechol substances on paper. Sodium molybdate (10%, w/v)–hydrochloric acid (0.5 *N*), (2:1) mixture was sprayed first; *o*-dihydric phenols gave a weak yellow colour. Sodium nitrite solution (0.5%, w/v) was then sprayed, the spots turning greenish yellow in colour. A final spraying with sodium hydroxide solution (0.5 *N*) resulted in the spots immediately becoming a strong medium-toned pink. The paper should not be made too wet. This test is about as sensitive as the diazotised *p*-nitraniline reaction, but is better for photographic purposes, since background colour is almost absent. 2,5-Dihydroxyphenolic compounds (*e.g.* gentisic or homogentisic acids) give a final medium brown colour, easily distinguished from that of true catechol substances.

(b) Diazotised *p*-nitraniline, prepared in the usual way, followed by sodium carbonate solution[1], was used as a spray for the detection of phenolic substances on chromatograms developed with both solvent systems. Catechol substances gave a typical cherry red to purple colour, with this reagent, except when borate buffers were used in the solvent system or as an electrolyte in paper electrophoresis. In these cases,

References p. 379.

TABLE I

R_F AND COLOUR REACTIONS OF VARIOUS PHENOLS AND PHENOLIC ACIDS

Ascending paper chromatography. (a) Paper: Whatman No. 4. Solvent system: benzene–glacial acetic acid–water (20:5 just saturated). (b) Paper: Whatman No. 4, buffered with borate buffer (9.54 g/l sodium tetraborate). Solvent system: *n*-butanol–ethanol–borate buffer (1:1:1).

Solvent system	*(a)*			*(b)*	
Substance	R_F	*Colour by reagent*		R_F	*Colour by reagent*
		Diazo-p-NA	*Evans'*		*Diazo-p-NA*
Miscellaneous					
Catechol	0.43	Cherry purple	+	0.70	Brown
Homocatechol	0.56	Red-purple	+	0.72	Brown-red
Phloroglucinol	0.00	Yellow-orange	—	0.87	Reddish mustard yellow
Resorcinol	0.12	Yellow-orange	—	0.94	Mustard yellow
Saligenin	0.62	Crimson	—	0.74	Brown-yellow
8-Hydroxyquinoline	0.60	Purple	—	—	—
3,4-Dihydroxy-ω-chloroacetophenone	0.21	Pale yellow	+	0.62	Yellow
DNP-glycine	0.71	—	—	0.70	—
DNP-ethanolamine	0.88	—	—	0.90	—
Monohydroxy acids					
o-Hydroxybenzoic acid	1.00	Bright red	—	0.74	Yellow-red
m-Hydroxybenzoic acid	0.50	Scarlet	—	0.68	Red
p-Hydroxybenzoic acid	0.42	Light crimson	—	0.65	Red
o-Hydroxyphenyl-propionic acid	0.70	Mauve	—	0.79	Red-mauve
m-Hydroxyphenyl-propionic acid	0.55	Pink	—	0.76	Bright crimson
p-Hydroxyphenyl-propionic acid	0.53	Blue-purple	—	0.73	Blue-purple
o-Hydroxy-*cis*-cinnamic acid	—	—	—	0.81	Purple
o-Hydroxy-*trans*-cinnamic acid	0.65	Bluish mauve	—	0.74	Purple
m-Hydroxycinnamic acid	0.53	Crimson	—	0.70	Crimson
p-Hydroxycinnamic acid	0.50	Bright blue	—	0.66	Blue-grey
o-Hydroxyphenyl-glyoxylic acid	0.22	Salmon	—	0.83	Salmon
p-Hydroxyphenyl-pyruvic acid	0.44	Purple	—	0.70	Purple
Dihydroxy acids					
2,3-Dihydroxybenzoic acid	0.43	Cherry purple	+	0.49	Pale brown
2,4-Dihydroxybenzoic acid	0.30	Brown mustard	—	0.53	Reddish brown
2,5-Dihydroxybenzoic acid	0.20	Yellow	—	0.55–0.85	Pale reddish brown
2,6-Dihydroxybenzoic acid	0.16	Yellow	—	0.78	Brown-grey
3,4-Dihydroxybenzoic acid	0.08	Cherry red	+	0.30	Brown
3,5-Dihydroxybenzoic acid	0.02	Bright yellow	—	0.54	Yellow
2,3-Dihydroxyphenyl-acetic acid	0.15	Cherry purple	+		
2,5-Dihydroxyphenyl-acetic acid	0.03	Brown	—	0.65	White
3,4-Dihydroxyphenyl-acetic acid	0.05	Cherry red	+	0.39	Light brown
2,3-Dihydroxyphenyl-propionic acid	0.28	Cherry purple	+	0.45	Medium orange
2,5-Dihydroxyphenyl-propionic acid	0.09	Brown	—		
3,4-Dihydroxyphenyl-propionic acid	0.13	Cherry red	+	0.42	Quenched red
2,5-Dihydroxyphenyl-cinnamic acid	0.04	Yellow	—	0.4–0.6	Pale brown
3,4-Dihydroxycinnamic acid	0.08	Brownish purple	+	0.40	Grey-brown
Monohydroxydicarboxylic acids					
3-Hydroxyphthalic acid*	—	—	—	—	—
4-Hydroxyphthalic acid	0.02	Bright crimson	—	0.41	Red
Dihydroxydicarboxylic acids					
3,4-Dihydroxyphthalic acid	0.02	Red	+	0.20	Quenched orange
4,5-Dihydroxyphthalic acid	0.01	Pink	+	—	—

* 3-Hydroxyphthalic acid does not appear to give a diazo-*p*-NA colour.

(Contd. on p. 376)

References p. 379.

TABLE I (*continued*)

Solvent system	*(a)*			*(b)*	
Substance	R_F	*Colour by reagent*		R_F	*Colour by reagent*
		Diazo-p-NA	*Evans'*		*Diazo-p-NA*
Lactones					
2,5-Dihydroxyphenyl-acetic acid lactone	0.03	Light brown	—	Streak	Brown
2,5-Dihydroxyphenyl-pyruvic acid lactone	0.20	Yellow-orange	—	0.79	Mustard yellow
Aldehydes					
2,5-Dihydroxybenzaldehyde	0.63	Pale yellow	—	0.93	White
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	0.13	Pale yellow	+	0.62	Yellow

quenched colours (yellowish brown instead of dark cherry red to purple colours) were observed. The borate complexing effect, noted by WACHTMEISTER[4], is presumably responsible for the quenching of the diazo colour of catechol substances. These reactions are useful confirmatory tests for catechol substances. Table I gives R_F values and colours obtained using a variety of phenolic substances.

Effect of substituents in the aromatic nucleus on R_F value

Table I shows the effect on R_F of the position of the hydroxyl group in monohydroxy-aromatic acids (*ortho* $\gg$ *meta* $>$ *para*). The introduction of a second hydroxyl group leads to a reduction of R_F values. Increased separation of the hydroxyl groups reduces the R_F value in the benzene–acetic acid–water, solvent—*e.g.* 2,3- $>$ 2,4- $>$ 2,5- $>$ 2,6-dihydroxybenzoic acids, but increases the R_F values in the *n*-butanol–ethanol–borate buffer solvent. In the former solvent further separation of the substituents in the aromatic nucleus (*e.g.* 3,4- and 3,5-dihydroxybenzoic acids) decreases the R_F even further. This decrease in the R_F values is presumably connected with an increase in solubility of the free acids in water.

The "anomalies" which occur when the *n*-butanol–ethanol–borate buffer system is used are probably due to two factors: firstly, the phenolic acids are partitioned as their sodium salts, and secondly, the complexing effect of the borate ion influences the partition of catechol substances.

PAPER ELECTROPHORESIS

The application of this technique to the separation of phenolic substances using a weak borate buffer (9.54 g/l, sodium tetraborate) also proved to be useful.

Horizontal paper electrophoresis was employed (paper strip: 24″ × 6″) and the time taken was 7 h (10 V/cm; 5–10 mA). The migration values of various phenolic substances are given in Table II. Zero marker: DNP-ethanolamine. The detection reagent used was diazotised *p*-nitraniline.

This buffer can be used for the study of sugars, glycosides and related aglycones. Preliminary results show that this borate buffer is also suitable for the study of plasma proteins (Azocarmine B detection).

References p. 379.

TABLE II

MDG VALUES AND COLOUR REACTIONS OF VARIOUS PHENOLS AND PHENOLIC ACIDS AFTER PAPER ELECTROPHORESIS

Borate buffer: 9.54 g/l sodium tetraborate. Zero marker: DNP-ethanolamine.

$$MDG = \frac{\text{Migration of substance}}{\text{Migration of DNP-glycine}}$$

Time: 7 h. 10V/cm, 5–7 mA, Whatman No. 4.

Substance	*MDG*	*Colour by diazo-p-NA reagent*
Miscellaneous		
Catechol	1.18	Pale brown
Homocatechol	1.02	Light brown
Phloroglucinol	1.47 (streaky)	Brown
Resorcinol	0.42	Yellow
Saligenin	1.02	Yellow-orange
3,4-Dihydroxy-ω-chloroacetophenone	0.70	Brown
Monohydroxymonocarboxylic acids		
o-Hydroxybenzoic acid	1.28	Yellow
m-Hydroxybenzoic acid	1.28	Crimson
p-Hydroxybenzoic acid	1.39	Red
o-Hydroxyphenyl-propionic acid	1.12	Mauve
m-Hydroxyphenyl-propionic acid	1.05	Mauve
p-Hydroxyphenyl-propionic acid	1.08	Purple
p-Hydroxyphenyl-pyruvic acid	1.13	Purple
o-Hydroxy-*cis*-cinnamic acid	1.08	Red-purple
o-Hydroxy-*trans*-cinnamic acid	1.20	Purple
m-Hydroxycinnamic acid	1.15	Crimson
p-Hydroxycinnamic acid	1.27	Blue
o-Hydroxyphenyl-glyoxylic acid	1.35	Orange
Dihydroxymonocarboxylic acids		
2,3-Dihydroxybenzoic acid	1.46	Brown
2,4-Dihydroxybenzoic acid	1.60	Dull red
2,5-Dihydroxybenzoic acid	1.20	Grey-brown
2,6-Dihydroxybenzoic acid	1.37	Mustard yellow
3,4-Dihydroxybenzoic acid	1.70	Pale steel grey
3,5-Dihydroxybenzoic acid	1.34	Brownish orange
2,3-Dihydroxyphenyl-acetic acid	1.90	Pale orange
2,5-Dihydroxyphenyl-acetic acid	1.1–1.55 (streak)	Pale brown
3,4-Dihydroxyphenyl-acetic acid	1.70	Quenched purple
2,3-Dihydroxyphenyl-propionic acid	1.60	Pale orange
2,5-Dihydroxyphenyl-propionic acid	1.25–1.80 (streak)	Pale brown
3,4-Dihydroxyphenyl-propionic acid	1.55	Pale orange
2,5-Dihydroxycinnamic acid	1.3–1.9 (streak)	Pale brown
3,4-Dihydroxycinnamic acid	1.49	Brownish yellow
2,5-Dihydroxyphenyl-pyruvic acid	0.88	Yellow
Lactones		
2,5-Dihydroxyphenyl-acetic acid lactone	0.9–1.88 (streak)	Medium brown
Aldehydes		
2,5-Dihydroxybenzaldehyde	0.80	Grey
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	1.10	Yellow-brown
Monohydroxydicarboxylic acids		
3-Hydroxyphthalic acid	—	—
4-Hydroxyphthalic acid	1.83	Crimson
Dihydroxydicarboxylic acids		
3,4-Dihydroxyphthalic acid	2.00	Quenched orange
4,5-Dihydroxyphthalic acid	2.05	Quenched orange

References p. 379.

TABLE III

R_F VALUES OF VARIOUS SUGARS AND RELATED COMPOUNDS

Ascending paper chromatography. Paper: Whatman No. 4 buffered with borate buffer. Solvent: *n*-butanol–ethanol–borate buffer (1:1:1). Buffer: sodium tetraborate (9.54 g/l). Detection reagent: alkaline $AgNO_3$.

Substance	R_F	*Substance*	R_F
Arabinose	0.22	Inositol	0.24
Arbutin	0.72	Mannitol	0.30
Ascorbic acid	0.28	Quinic acid	0.42
Cellobiose	0.35	Raffinose	0.25
Erythritol	0.27	Rhamnose	0.50
Fructose	0.23	Salicin	0.77
Fucose	0.40	Shikimic acid	0.27
Galactose	0.27	Sorbitol	0.29
Glucosamine	0.24–0.40	Sorbose	0.25
Glucose	0.28	Sucrose	0.42
Glucuronic acid lactone	0.20	Xylose	0.23

TABLE IV

MDG VALUES OF VARIOUS SUGARS AND RELATED COMPOUNDS

Obtained by paper electrophoresis using a borate buffer (9.5 g/l sodium tetraborate). Detection reagent: alkaline $AgNO_3$. Time: 7 h. 10 V/cm, 5–7 mA. Whatman No. 4 paper.

Substance	*MDG*	*Substance*	*MDG*
Arabinose	1.03	Quinic acid	0.51
Cellobiose	0.27	Raffinose	0.30
Fucose	0.91	Rhamnose	0.53
Galactose	1.00	Sucrose	0.19
Glucose	1.12	Xylose	1.05
Inositol	0.53	Ascorbic acid	1.10

Sugars, glycosides and aglycones

The separation of sugars using the *n*-butanol–ethanol–borate buffer solvent was not as satisfactory as the results obtained for phenolic substances and hence it cannot be used as a general solvent system but it may prove useful in the separation of certain mixtures (see Table III). The same can be said of the paper electrophoretic results for the sugars (Table IV). CONSDEN AND STANIER[6] have used similar electrolytes for sugars.

The application of these paper-chromatographic and paper-electrophoretic methods to some glycosides and related aglycones has been carried out (Table V). Good separation of the glycosides and some of the related aglycones has been achieved.

Fractionation of other types of glycosides has been reported elsewhere[3].

References p. 379.

TABLE V

R_F AND MDG VALUES OF VARIOUS GLYCOSIDES AND AGLYCONES

Solvent: *n*-butanol–ethanol–borate buffer (1:1:1). (a) Sodium tetraborate solution (9.54 g/l). (b) CONSDEN's borate buffer[6]. Paper: Whatman No. 4 impregnated with respective buffer. Detection: U.V.

Solvent	*(a)*	*(b)*	*Electrolyte: (a)*
Substance	R_F	R_F	*MDG*
Glycosides			
Quercetrin**	0.44 (0.82)	0.69 (0.95)	0.98 (0.80)
Phloridzin	0.79	—	0.67
Rutin	0.29	0.29	0.88
Aglycones			
d-Catechin**	0.45 (0.49)	—	0.80 (0.98)
Fisetin	0.40	—	0.08
Formononetin	0.91	—	0.25
Genistein	0.86	—	0.01
Khellin	0.92	—	—0.30*
Morin	0.10	—	0.03
Myricetin	0.15	—	0.03
Quercetin**	0.38 (0.84)	0.25 (—)	0.36 (—0.10)
Robinetin	0.12	—	0.25
Tricin	0.50	—	—0.30*
DNP derivatives			
DNP-ethanolamine	0.90	—	0.00
DNP-glycine	0.70	—	1.00

* Did not move from start.

** Commercial samples contained an additional unknown minor constituent; the value for the unknown is given in brackets.

We are indebted to Dr. P. F. LLOYD for the DNP derivatives, to Dr. R. B. BRADBURY for genistein and formononetin and to Mr. W. S. FERGUSON for tricin. We are grateful to the A.R.C. for support.

SUMMARY

The paper chromatography of phenols (especially phenolic acids), aglycones, glycosides and certain sugars is carried out with two new solvents. The authors have also examined these substances with the aid of paper electrophoresis and a borate buffer. A detection reagent for *o*-diphenols on paper is described.

REFERENCES

1 E. LEDERER AND M. LEDERER, *Chromatography*, 2nd Ed., Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1957.
2 B. S. W. SMITH, *Ph. D. Thesis*, Univ. of Wales, 1954.
3 C. B. COULSON, *Biochem. J.*, 67 (1957) 10P; *Nature*, 180 (1957) 1297; *J. Sci. Food Agr.*, 9 (1958) 281.
4 C. A. WACHTMEISTER, *Acta Chem. Scand.*, 5 (1951) 976.
5 W. C. EVANS, *Biochem. J.*, 41 (1947) 376; see also, L. E. ARNOW, *J. Biol. Chem.*, 118 (1937) 531.
6 R. CONSDEN AND W. M. STANIER, *Nature*, 169 (1952) 783; 170 (1952) 1069.

Received March 27th, 1958

APPLICATION OF CIRCULAR PAPER CHROMATOGRAPHY TO THE DIFFERENTIATION OF BACTERIA BY ENZYMIC TESTS

EUGENIA SORU

Laboratory of Enzymology, Department of General Biochemistry, Dr. I. Cantacuzino Institute, Bucarest (Rumania)

The study of arginase and arginine dihydrolase in bacteria has shown that the presence of these arginine-degrading enzymes can serve as a differential test for certain species and bacterial types[1–5].

Our earlier investigations[6] have shown that arginase, the enzyme that degrades arginine to ornithine and urea, is present in very few bacterial species. For staphylococci we[5] found that a correlation exists between the presence of arginase and the pathogenicity of the various bacteria, which indicates that arginase has a special significance for these microorganisms. In the case of streptococci it was found that the enzymic system known as the arginine dihydrolase system, which converts arginine to ornithine, citrulline and ammonium, is only present in the haemolytic group, being absent in the virulent one. The degradation process of arginine can therefore serve as an important enzymic criterion for differentiating between the various bacterial species, and especially for purposes of differentiation within a group of the similar species. Therefore, a precise and at the same time simple method for determining the products of the enzymic degradation of arginine will be very useful.

Partition chromatography on filter paper, in the form of circular chromatography[7], possesses all the qualities of such a method. It was applied by us for purposes of differentiation, using an arginase test[5] in the case of staphylococci and an arginine dihydrolase test[4] in the case of streptococci.

PROCEDURE

The bacteria used were in the "*resting*" form. Bacteria from 18 to 20 hour-cultures on gelose were washed once with an isotonic saline solution and twice with distilled water; the final suspension had a microbial density of about 20–50 mg/ml (expressed as dry residues). This suspension was incubated at 37°, under a toluene layer, with a 1% solution of L-(+)-arginine hydrochloride in a buffer medium at pH 9.0 for the arginase test and at pH 8.0 for the arginine dihydrolase test. In the case of both enzymes the presence of Mn^{+2} was necessary for enzymic activity. The incubation time was 12 to 24 h. Control systems containing bacteria inactivated by keeping at 100° for 60 min, were treated in the same manner. Each experiment comprised the following systems:

References p. 384.

System I: 1 ml bacterial suspension (20–50 mg/ml)
1 ml buffer solution (M/15)
1 ml L-(+)-arginine monohydrochloride (1% soln.)
1 ml toluene

System II: 1 ml inactivated bacterial suspension (60′, 100°)
1 ml buffer solution (M/15)
1 ml L-(+)-arginine monohydrochloride (1% soln.)
1 ml toluene

After incubation (12 to 24 h at 37°) both systems were centrifuged and the supernatants submitted to qualitative and quantitative chromatographic determination on the same circular paper (diameter 30 cm).

The samples to be tested were spotted on different points on the circumference of a circle (about 5 cm diameter) drawn from the center of the circular paper. The test samples and known quantities of standard amino acid solution (0.005 ml of M/100 solution of arginine, citrulline, ornithine) as well as urea solution, were spotted on the same paper. The spotting of the solution was done with a micrometer syringe. The circular paper was placed on the surface of a Petri dish (25 cm diameter) containing the solvent mixture in a small dish at the center. A filter paper wick going through the center of the circular paper established contact between the solvent mixture and the circular paper disc.

The circular paper was held on the surface of the Petri dish by the lid, a space being kept between the paper and the lid. The whole set-up was covered with a bell jar.

The solvent mixtures used, were those that give a distinct separation of the amino acids being investigated[8] (namely arginine, ornithine, citrulline and urea). They were: *n*-Butanol–acetic acid–water (40:10:50); pyridine–isoamyl alcohol–acetic acid–water (80:40:10:40); phenol–isopropyl alcohol–water (70:50:25).

After the chromatograms had been irrigated for 24 hours the filter paper was dried at 90° and sprayed with a 0.2% ninhydrin solution in chloroform for the detection of all amino acids, with 8-hydroxyquinoline reagent for arginine[9] and with the Ehrlich-Dent reagent for urea.

For the quantitative determination of the amino acids identified by the qualitative test, the filter paper was sprayed with the following solution according to BARROLLIER[10]: 73 mg $CdCl_2$, 6 ml H_2O, 0.3 ml glacial acetic acid, 100 ml acetone, 2 g ninhydrin. After heating the chromatograms at 60° for 20 min the spots were cut out and put into separate test tubes containing 4 ml of methanol for extraction of the colour. The coloured extracts were determined by photometric reading against standard amino acid solutions that had been submitted to the same treatment.

RESULTS

(*a*) *Staphylococci* (*arginase test*)

Pathogenic staphylococci. Chromatographic investigation of the corresponding systems after incubation with arginine showed that arginine had completely or partially

References p. 384.

disappeared and that ornithine as newly formed amino acid was always present (spot A). The intensity of the enzymic activity was directly proportional to the amount of ornithine formed and to the amount of arginine that had disappeared from the same chromatogram (spots A and B).

Non-pathogenic staphylococci. Chromatographic investigation of the systems incubated with arginine revealed the absence of ornithine and of all other amino acids with the exception of the arginine initially added (spot D). The concentration of arginine on these chromatograms was the same as that found with the inactivated test system. The difference between the pathogenic and the non-pathogenic staphylococci

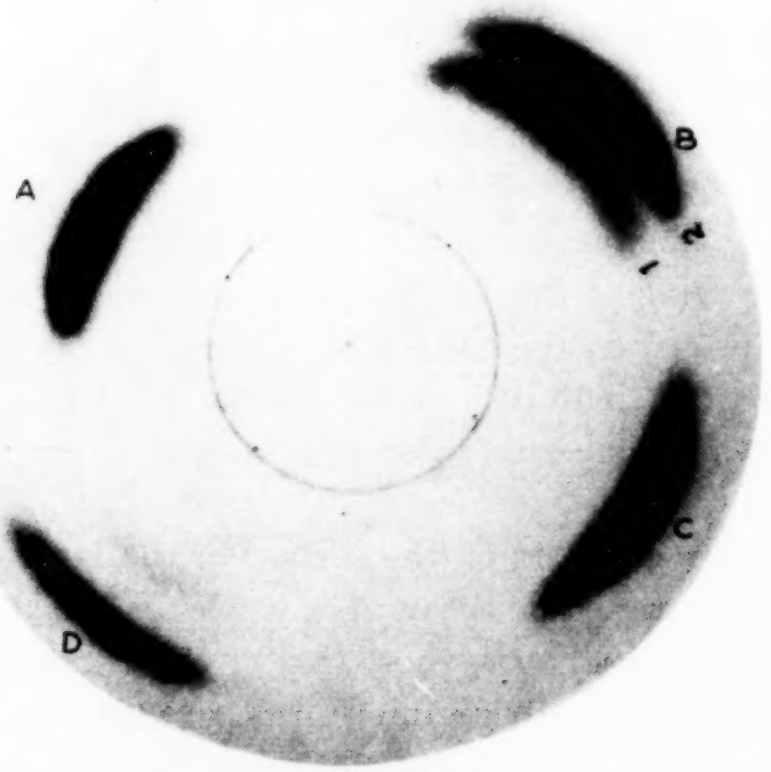


Fig. 1. Chromatographic differentiation between pathogenic and non-pathogenic staphylococci by an arginase test. A. Pathogenic staphylococci (Arginase-positive strain). Complete conversion of arginine to ornithine (spot of ornithine). B. Pathogenic staphylococci (arginase-positive strain). Partial conversion of arginine to ornithine (spots of ornithine (1) and arginine (2)). C. Pathogenic staphylococci (arginase-positive strain). Inactivated by heat (60′, 100°). Arginine not transformed (spot of arginine). D. Non-pathogenic staphylococci (arginase-negative strain). Arginine not transformed (spot of arginine).

was clearly illustrated by the appearance of ornithine in the case of the former group, and the absence of ornithine in the case of the latter. The presence of urea, identified on the chromatograms with the Ehrlich-Dent reagent and confirmed by the precipitation reaction with xanthydrol, indicates that the metabolism of arginine in pathogenic organisms proceeds via a ureogenic route. The arginase test (based on establishing the presence of ornithine and urea) has been shown, by comparison to classic tests of pathogenicity (coagulases, haemolysins, etc.) to be a valid criterion for the pathogenicity of staphylococci. Fig. 1 illustrates the chromatographic aspect of the metabolism of arginine in staphylococci.

(*b*) *Streptococci* (*arginine dihydrolase test*)

The chromatographic investigation of the metabolism of arginine in streptococci

References p. 384.

reveals the following facts: in the case of haemolytic streptococci arginine disappears completely or partially and concomitantly ornithine, or ornithine and citrulline, appear. Chemical assay indicates that ammonia is formed in these organisms and not urea, therefore the reaction is catalysed by arginine dihydrolase, as has been shown by various investigators. Recently[11], it has been established that arginine dihydrolase consists of two distinct enzymic systems: arginine desamidase, which hydrolyses arginine to citrulline and NH_3 and citrullinase which decomposes citrulline to orni-

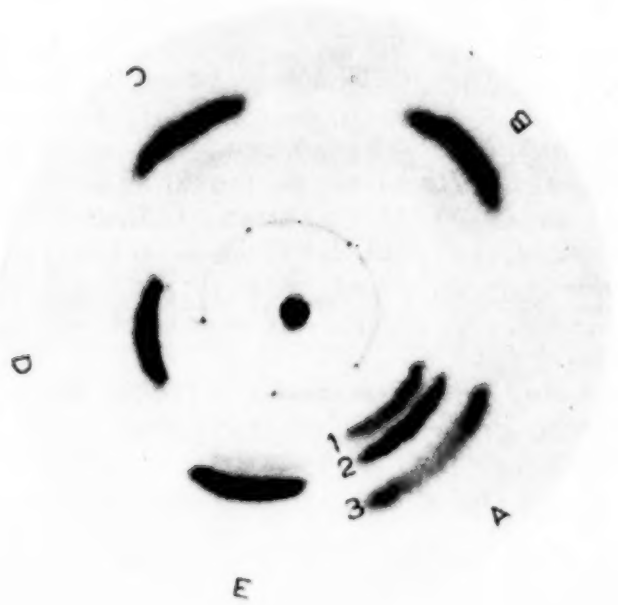


Fig. 2. Chromatographic differentiation within the streptococcus group by the arginine dihydrolase test. E. Viridans group: intact arginine spot. B and C. Haemolytic group: formation of citrulline and traces of ornithine. D. Haemolytic group: formation of ornithine. A. Solution containing known amounts of ornithine (1), arginine (2) and citrulline (3).

thine, NH_3 and CO_2; in the case of haemolytic streptococci two different groups can be distinguished on the basis of the intensity of their citrullinic action. Under identical experimental conditions one subgroup transforms citrulline into ornithine much more rapidly than the other; this is shown on the chromatogram (Fig. 2) by the complete disappearance of citrulline from the system (spot D). In the second subgroup, chromatographic analysis reveals the presence of citrulline and only traces of ornithine (spots C and B).

In the case of the viridans group of streptococci, neither ornithine nor citrulline is found to be present and there is no alteration of the initial concentration of arginine added as substrate to the system (spot E).

The chromatographic picture of the metabolism of arginine in streptococci shows that there are three distinct groups:

(a) Strains that do not degrade arginine (the viridans group).

(b) Strains that degrade arginine, forming citrulline and eventually also ornithine.

(c) Strains that degrade arginine, forming ornithine. These last two groups are subdivisions of the haemolytic streptococci.

Fig. 2 shows the chromatographic aspect of the metabolism of arginine in streptococci.

References p. 384.

SUMMARY

This paper presents the results of the application of circular filter paper chromatography to the differentiation of pathogenic and non-pathogenic staphylococci by means of an arginase test, and to the differentiation of haemolytic streptococci and viridans streptococci by an arginine dihydrolase test.

Chromatographic assay indicates that in the group of staphylococci only the pathogenic and not the non-pathogenic staphylococci metabolize arginine to ornithine and urea (presence of arginase).

Chromatographic assay indicates that in the group of streptococci only the haemolytic streptococci and not the viridans streptococci metabolize arginine to ornithine and citrulline, or to ornithine or citrulline only (presence of arginine dihydrolase in the haemolytic group).

REFERENCES

1 E. F. GALE, *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 26 (1945) 225.
2 H. D. SLADE AND W. C. SLAMP, *J. Bacteriol.*, 64 (1952) 455.
3 C. F. NIVEN JR., K. L. SMILEY AND J. M. SHERMAN, *J. Bacteriol.*, 43 (1942) 651.
4 E. SORU *et al.*, *Bul. ştiinţ., Acad. rep. populare Române*, 9 (1957) 179.
5 E. SORU *et al.*, *Studii cercetări inframicrobiol.*, 3 (1957) (in the press).
6 E. SORU *et al.*, *Bul. ştiinţ., Acad. rep. populare Române*, 3 (1956) 53.
7 L. RUTTER, *Nature*, 161 (1948) 435.
8 I. GARCIA AND J. COUERBE, *Bull. soc. chim. biol.*, 38 (1956) 791.
9 G. CERIOTTI AND L. SPANDRIO, *Biochem. J.*, 66 (1957) 603.
10 J. BARROLLIER, *Naturwissenschaften*, 42 (1955) 416.
11 V. A. KNIVETT, *Biochem. J.*, 58 (1954) 480.

Received January 20th, 1958

SHORT COMMUNICATIONS

The use of iodine for the detection of lipids

The detection of complex lipids and terpenoids after electrophoretic or chromatographic separation on filter paper often presents some difficulty due to absence of markedly reactive groups in these compounds. We have found that treatment of the developed papers with iodine often affords a satisfactory means for locating many lipids including steroids, unsaturated fatty acids and terpenoid hydrocarbons.

BRANTE[1] introduced the use of iodine vapor for the detection of nitrogenous compounds and it has been subsequently adopted for the observation of a number of relatively unreactive organic compounds (non-reducing carbohydrates, etc.) on paper[2,3].

The paper chromatogram or electrophoretic strip is thoroughly dried and exposed overnight

TABLE I

SENSITIVITY OF LIPIDS TO IODINE VAPOR (24 HOUR EXPOSURE) ON WHATMAN NO. 1 PAPER

Compound	*Quantity in μg*		
	50	*100*	*200*
Triolein	++	+++	+++
Tristearin	±	±	+
Monomyristin	—	±	±
Phrenosine	+	+	++
Sphingomyelin	++	+++	+++
Phosphatidyl choline	++	+++	+++
Phosphatidyl ethanolamine	+	+++	+++
Lipositol	+	+	++
Cholid acid	+	+	+
Desoxycholic acid*	+	+	+
Lithocholic acid	+	+	+
Trihydroxycoprostane	+	+	+
Cholesterol	++	++	++
Lanosterol	+	+	+
Ergosterol	+++	+++	+++
β-Sitosterol	+	++	++
Progesterone	+++	+++	+++
Testosterone	+++	+++	+++
Estradiol	+	+	+
Androstenedione	+	+	+
Cortisone	+	+	+
Hydrocortisone	++	++	++
Corticosterone	+	++	++
Desoxycorticosterone	++	++	++
Kryptogenin	++	++	++
Diosgenin	++	++	++
Pimaric acid	+	++	++
Abietic acid	++	++	++
β-Carotene	+	++	++
Lycopene	±	+	+
Squalene	+	+	+
Vitamin A	+++	+++	+++

* Desoxycholic acid required a long period of time (48 hours) in the iodine before reaction was noticeable.

in a closed chamber containing a few crystals of iodine. The presence of the lipids (Table I) is usually revealed within a few minutes as characteristically colored zones (brown or yellow). The precise coloration appears to vary with the acidity or alkalinity of the dry paper. Inspection under ultra-violet light facilitates the detection of feebly staining compounds.

Alternatively, the dried papers may be sprayed or dipped in a 0.2% solution of iodine in petroleum ether or diethyl ether and the excess iodine allowed to volatilize in a gentle draught of air.

The use of iodine has been previously reported for the detection of certain steroids[4,5].

We are indebted to Doctors ELMER E. JONES, ALVIN MARKOWITZ, DANIEL SWERN and D. W. WOOLLEY for the gift of materials.

Department of Biochemistry, The School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pa. (U.S.A.)

MICHAEL W. WHITEHOUSE
ANN E. BRESLER
EZRA STAPLE

[1] G. BRANTE, *Nature*, 163 (1949) 651.
[2] G. B. MARINI-BETTÒLO-MARCONI AND S. GUARINO, *Experientia*, 6 (1950) 309.
[3] R. M. GREENWAY, P. W. KENT AND M. W. WHITEHOUSE, *Research (London)*, 6 (1953) 6S.
[4] D. KRITCHEVSKY AND M. R. KIRK, *Arch. Biochem. Biophys.*, 35 (1952) 346.
[5] I. E. BUSH, *Nature*, 166 (1950) 445.

Received March 19th, 1958

Correlation of ion exchange column and equilibration experiments under non-ideal conditions

In devising separative procedures involving ion exchange chromatography, an investigator is ordinarily faced with the problem of monitoring effluent from the column. Since many experiments may be necessary to delimit conditions and to check on completeness of recovery, apparatus for automatic monitoring of column effluent is necessary for efficient operation. This represents a severe disadvantage, particularly for the investigator who desires to consider only a single separation in the course of other work and who may not have the necessary monitoring equipment readily available. The problem would be somewhat simplified if the initial experiments could be performed using a batchwise equilibration technique with these results applied to design of a column separation.

Procedures for correlating column and equilibration experiments have been presented; however, they refer to exchange reactions involving only monovalent ions in which the influent ion is present only in trace concentrations, allowing the approximation of ideal behavior both in solution and resin phases to be made. For practical purposes it is often necessary to perform separations of polyvalent ions in concentrations too high to be considered ideal. This paper reports the application of data obtained in shaking experiments to column experiments involving divalent ions in concentrations up to 0.5 *M* without any attempt to calculate activity coefficients, to determine to what extent failure of ideal behaviour would distort the results. The exchange of lead(II) nitrate in 2 *N* nitric acid with a cation resin in the hydrogen from has suitable elution characteristics.

Apparatus and reagents

Ion exchange resin. Dowex 50-X12, 100–200 mesh, analytical grade cation resin was used. This resin was obtained from Bio-Rad Laboratories, Berkeley, Calif., and had been washed repeatedly with acid and alkali and finally converted to the hydrogen form. It contained approximately 45% water and had a capacity of 5.01 mequiv. per oven-dried gram. The void space in water averaged 48%, the density 0.46 g/ml.

Standard lead solution. Lead solutions were prepared from analytical reagent grade $Pb(NO_3)_2$ and were standardized by precipitation of $PbSO_4$ or by amperometric titration with $K_2Cr_2O_7$ in acetic acid–sodium acetate buffer, using a D. M. E. at an applied voltage of zero *vs.* S. C. E.

Other reagents. Other reagents, with one exception, were analytical grade and were used without further purification. Gelatin, for maximum suppression in polarographic determination of lead, showed no blank.

Polarograph. A Sargent Model XXI, pen-recording polarograph and a Sargent "Ampot" amperometric titrimeter were used for lead determinations. Polarographic determinations were carried out using a controlled head of mercury above the D. M. E. and controlled temperature to allow use of a calibration curve.

Experimental

Equilibration experiments. Equilibrations were performed by shaking 1 g (wet basis) resin samples with 25-ml volumes of solutions of initially known composition for one hour. Longer equilibration periods up to 24 h showed no significant change. Resin moisture content was determined for each series of experiments by drying separate samples at 110° for 48 h. Supernatant solutions were analyzed for lead polarographically and for acid by titration. The number of equivalents of lead and hydrogen on the resin at equilibrium was determined by difference. All experiments were performed at 22° ambient temperature.

Column experiments. The columns used varied from 2.0 to 7.6 ml volume, and from 2.3 to 10.5 cm in length. In each case, the volume of influent lead solution was 1 ml, followed by elution with 2.00 N HNO_3. Flow rate, determined by the resistance of the column packing, varied from 1.5 to 3.2 cm/min. Columns were prepared by introducing resin samples in a water slurry to exclude air, but without other precautions to avoid channeling. Void space was determined by measuring the volume of water required to elute chromate ion from a column of known volume. Elution of lead from columns was followed polarographically, utilizing a cell that permitted introduction of the polarograph capillary directly into the effluent stream[1]. Data from column experiments showed no significant abnormal variation that could be attributed to variation in column dimensions or flow rate; accordingly, they are presented without reference to these factors.

Discussion

KRAUS AND MOORE[2] describe the movement of a band on an exchange column in terms of an elution constant: $E = dA/V$, where d is the distance moved by the band, A is the cross-sectional area of the column and V is the volume of elutrient. If correction is made for the void space between the particles of resin, the experimentally determinable E may be related to the distribution coefficient, D: $E = 1/(D + i)$, where i is the void fraction of the column. In performing a shaking experiment, the distribution of metal between solution and resin phases may be described by the coefficient K_d (moles per gram of resin (dry basis)/moles per ml of solution) which is related to D: $D = K_d\varrho$, where ϱ is the density of the resin.

The distribution coefficient for a polyvalent ion in an exchange reaction is a function of the concentration of the ion, even under ideal conditions. Therefore, correlation of column and shaking experiments involving a two-to-one exchange requires that the concentration of the influent ion in the aqueous phase of the resin be estimated, taking into consideration influent concentration, column dimensions, void fraction of the resin and the spreading of the band as it moves along the column. This estimation can be made by considering the exchange as an equilibrium reaction. For the exchange reaction:

$$Pb^{++} + 2\,\overline{H}^{+} = \overline{Pb}^{++} + 2\,H^{+},$$

(symbols carrying bars indicate ions held on the resin), the equilibrium quotient, K_c: $K_c = (\overline{Pb}^{++})\,(H^{+})^2/(Pb^{++})\,(\overline{H}^{+})$, may be expressed in terms of molar concentrations of ions in solution and of equivalent fractions of ions in the resin phase. If K_c remains constant with changing concentration of lead, distribution coefficients for the actual conditions of the column may be calculated. To check the validity of the approximation, a series of equilibrations was performed, holding the weight of resin, volume of solution and concentration of nitric acid constant and varying

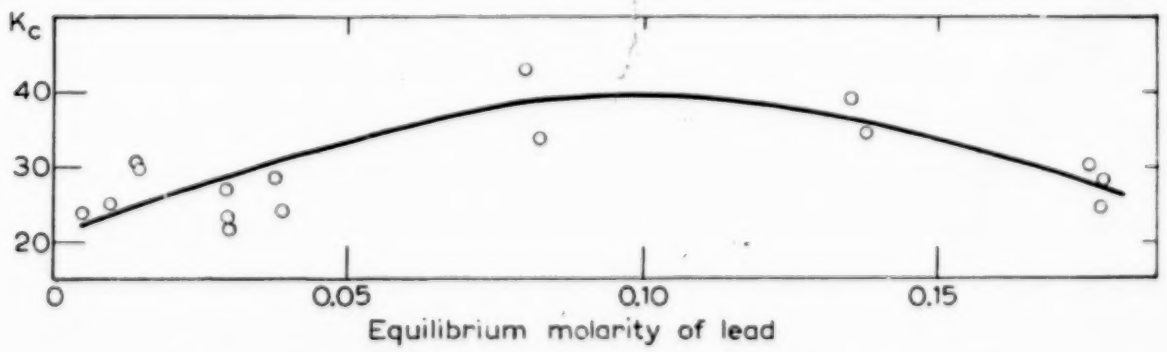


Fig. 1. Effect of change of Pb(II) concentration on K_c.
25 ml of 2.00 N HNO_3, 0.55 g resin (dry basis).

the amount of lead. The results shown in Fig. 1 indicate that only a small change in K_c occurs when the concentration of lead is changed. On this basis, a K_c value of 30 was used to calculate the distribution coefficients of the second column of Table I. These calculations were made by considering a 1-ml segment of the ion exchange column, which would contain 0.48 ml of the aqueous phase and 0.46 g (dry basis) of resin, to be filled with the influent solution of specified concentration. Calculated values may be compared with analogous D values obtained by direct column measurement, shown in the third column of Table I. These values are, with one exception, averages of results of several experiments. To indicate the magnitude of experimental error, absolute values of

TABLE I

DISTRIBUTION COEFFICIENTS FOR LEAD(II) ON DOWEX 50 IN 2.00 HNO_3

Initial lead molarity	*D calc. from equilibration measurements*	*D from column measurements*	*Av. deviation of column measurements*
0.004	8.6	9.0	—
0.025	8.5	7.6	0.8
0.05	8.3	8.5	0.7
0.10	8.0	8.4	0.1
0.20	7.4	7.2	0.4
0.30	6.9	6.2	0.3
0.40	6.1	5.5	0.2
0.50	5.6	5.4	0.8

deviation are shown. The agreement between results for column and equilibration experiments over a fairly wide range of concentrations indicates that one should be able to devise ion exchange separation procedures on the basis of shaking experiments without having to resort to monitoring the effluent from columns.

For a column of 1 cm^2 cross-sectional area and 10 cm length, the distribution coefficients of Table I correspond to elution volumes varying from 57 to 94 ml. This illustrates the fact that when a separation is based on successive elution of ions with only slightly different characteristics, *e.g.*, separation of magnesium from calcium by elution with strong acid, the effect of change of concentration may become important.

Summary

To evaluate the correlation of ion exchange column operation with batchtype equilibration operation under non-ideal conditions, the system $Pb(NO_3)_2$–HNO_3–Dowex 50 was studied. Distribution coefficients based on equilibration experiments were calculated and compared with distribution coefficients obtained by direct measurement from column operation. Sufficiently close agreement was obtained between the two types of experiments to suggest the feasibility of making preliminary investigation of ion exchange chromatographic separations by simple shaking experiments, rather than by more involved column experiments.

Department of Chemistry, University of Texas, Austin, Tex. (U.S.A.) CHARLES K. MANN

[1] C. K. MANN, *Anal. Chem.*, 9 (1957) 1385.
[2] K. A. KRAUS AND G. E. MOORE, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 9.

Received March 10th, 1958

RECEIVED
OCT 3 1958
ESSO TECHNICAL
LIBRARY

ÜBERSICHT

ZUR PAPIERCHROMATOGRAPHIE DER PHOSPHORVERBINDUNGEN

I. ANORGANISCHE PHOSPHORVERBINDUNGEN

HANS HETTLER

Chemisches Institut der Universität, Heidelberg (Deutschland)

In der Papierchromatographie anorganischer und organischer Phosphorverbindungen zeichnet sich eine gewisse Standardisierung der Arbeitsmethoden ab. Gleichzeitig werden die Verfahren in steigendem Masse zur Lösung spezieller Aufgaben herangezogen. In der vorliegenden Übersicht wird versucht, die Anwendungsbereiche der verschiedenen Verfahren gegeneinander abzugrenzen.

A. Allgemeiner Teil
B. Die Papierchromatographie anorganischer Phosphorverbindungen
1. Die kondensierten Phosphate
2. Phosphor–Sauerstoffverbindungen niederer Wertigkeitsstufen

A. ALLGEMEINER TEIL

Eine spezielle Methode der Papierchromatographie darf als leistungsfähig gelten, wenn eine scharfe Trennung der Substanzen erreicht wird und die R_F-Werte bei der Reproduktion unter konstanten Bedingungen innerhalb eines gewissen Fehlerbereichs gleich bleiben. Ganz allgemein müssen zur Reproduzierbarkeit der R_F-Werte einige Bedingungen erfüllt sein[1,2].

(a) Temperaturkonstanz $\pm$ 0.5° im Chromatographieraum. Das Auftreten eines Temperaturgradienten im Chromatographiegefäss kann zu unregelmässiger Wanderung der Lösungsmittelfront Anlass geben. Da der Verteilungsquotient eine Funktion der Temperatur darstellt[3], ist die Zusammensetzung gesättigter Phasen temperaturabhängig. Änderungen der Zusammensetzung eines Lösungsmittels bringen aber beträchtliche Abweichungen der R_F-Werte mit sich. Bei der Verwendung von Gemischen mit leichtflüchtigen Bestandteilen (Äther, konz. Ammoniak, Äthylformiat, Methanol) und leicht veresternder Säure–Alkoholgemische sollte die Arbeitstemperatur unterhalb 15° liegen.

(b) Bei jedem Chromatogramm muss mindestens eine Vergleichssubstanz (Leitchromatogramm) mitlaufen.

Treten bei einem Lösungsmittel Abweichungen $>$ 0.02 vom gewöhnlichen R_F-Wert einer Leitsubstanz auf, so sollte das Lösungsmittelgemisch erneuert werden.

In der Papierchromatographie der Phosphorverbindungen muss man allerdings häufig mit grösseren Abweichungen (0.05 Einh.) rechnen[2].

Literatur S. 409/410.

(c) Die Lösungsmittelgemische sollen bei der Temperatur des Chromatographieraumes angesetzt und auch dort aufbewahrt werden. Der erste Lauf eines frisch angesetzten Lösungsmittels wird besser nicht ausgewertet; erst beim zweiten Lauf sind die R_F-Werte verlässlich. Die Gemische können in der Regel mehrere Tage benutzt werden, aber auch bei Reihenuntersuchungen nicht öfter als 7–8 mal[4].

(d) Nach Möglichkeit sollen gleichbleibende Laufzeiten (Steighöhen) eingehalten werden. Die Zusammensetzung und Dicke einer aufsteigenden Flüssigkeitsschicht kann nicht über die ganze Laufstrecke als konstant angenommen werden. Daraus ergibt sich eine Abhängigkeit der R_F-Werte von der Steighöhe der Front[5].

(e) Die meisten der hier behandelten Methoden sehen keine Äquilibrierung der chromatographischen Papiere vor.

(f) Um vergleichbare R_F-Werte zu erhalten, verwendet man Papiere der gleichen Fertigungsserie.

In einigen neueren Arbeiten werden die Möglichkeiten geprüft, Trennschärfe und Wanderungsgeschwindigkeit durch eine bestimmte Formgebung des Papiers zu beeinflussen[6,7].

Papierformen

Die einfachste und verbreitetste Form stellt der in rechteckige Streifen geschnittene Papierbogen dar (Fig. 1, Form 1). Bei dieser Form beobachtet man Rundflecke oder eine bevorzugte Ausdehnung der Flecke in der Wanderungsrichtung.

Eine abschätzende Rechnung, die von den Standardbedingungen (1–2 mm³ einer 1% Lösung berechnet auf P ergibt einen Fleck von 1.7–2.2 cm Radius; 25 cm

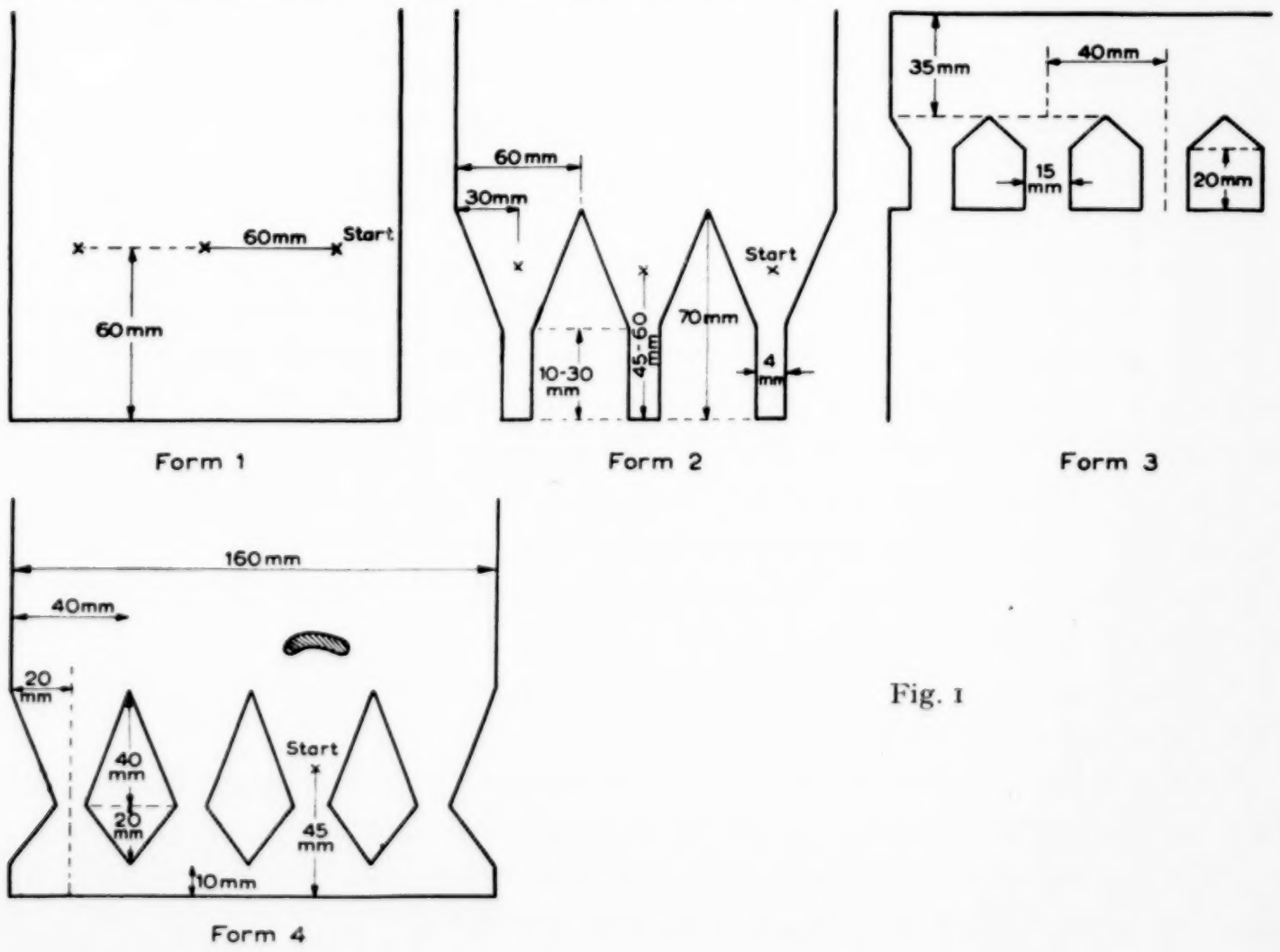


Fig. 1

Literatur S. 409/410.

Steighöhe der Front ab Startpunkt) ausgeht, fordert—um eine Überlappung der Flecke zu vermeiden—einen Mindestunterschied der R_F-Werte von 0.055. In der Praxis ist die Trennung oft für Substanzen mit einer R_F-Wertdifferenz von 0.06–0.09 recht unvollkommen[7].

THILO UND GRUNZE[7] führen die Zungenform (Form 2)[6,8] in die Chromatographie der Phosphate ein. Bei Anwendung dieser Form liegt die Hauptausdehnung des Flecks parallel zur Lösungsmittelfront, also senkrecht zur Wanderungsrichtung.

Die Trennschärfe ist gegenüber Form 1 erheblich verbessert, man muss aber mit einer verlängerten Laufzeit rechnen.

Für die absteigende Chromatographie bietet eine von SCHWERDTFEGER[9] vorgeschlagene Form (Form 3) einen erhöhten Trenneffekt bei wenig verlängerter Laufzeit.

Wir untersuchten verschiedene neue Formen unter dem Gesichtspunkt der erreichten Trennschärfe, des Arbeitsaufwands und der verlängerten Laufzeit auf ihre Brauchbarkeit.

Alle neuen Formen haben gemeinsam, dass die Wanderung des Lösungsmittels betrachtet werden kann als ein Vorgang, wie er sich ähnlich im Rundfilterchromatogramm abspielt. Das Lösungsmittel durchwandert, von einem Mittelpunkt ausgehend, ein Kreissegment, erfasst die aufgetragene Substanz und gibt dabei Anlass zu dem bekannten Verdünnungseffekt[10].

Auf Grund dieser Vorstellung wählten wir eine Form (Form 4), die nach unseren Erfahrungen Vorteile gegenüber den früheren Formen aufweist. Auch hier werden optimale Trennungen mit der Rundfiltermethode erreicht[11,40].

Trennschärfe und Form der Flecke. Störungen

Substanzen mit einem R_F-Wert < 0.6 treten bei Anwendung der neuen Formen, falls sie von mitwandernden Substanzen unbeeinflusst bleiben, in einer charakteristischen Nierenform auf (s. Form 4). Bei Substanzen mit einem hohen R_F-Wert, insbesondere bei Substanzen, die in Front wandern, entartet der Fleck zu einer geraden Linie.

R_F-Werte und Form der Flecke können beeinflusst werden durch Verdrängungs- und Randeffekte.

Bei unseren Untersuchungen zur chromatographischen Identifizierung von Reaktionsprodukten mit aliquoten Anteilen konnten deutliche Verdrängungseffekte beobachtet werden. Die Flecke verteilten sich dabei im Sinne maximaler Trennung, d.h. sie nahmen die Form und Fläche an, die eine Überlappung vermied. Ein typisches Verdrängungschromatogramm kann auftreten bei Substanzen, die unter den Bedingungen der Chromatographie Hydrolyse erleiden.

Auf den äusseren Bahnen der Chromatogramme, die den Gefässwänden am nächsten kommen, beobachtet man bisweilen Verschiebung und Verlagerung der in Randnähe wandernden Substanzen zum Rand hin oder ein ungleichmässiges Fortschreiten der Lösungsmittelfront.

Bei niederer Arbeitstemperatur tritt dieser, wohl durch Temperatureinflüsse mitverursachte Effekt zurück.

Literatur S. 409/410.

Bei analytisch wichtigen Chromatogrammen empfiehlt es sich daher, die beiden Aussenbahnen nicht zu verwenden[4].

Die quantitative Chromatographie vermeidet Störungen dieser Art durch folgende Anordnung der Substanzen:

Die eine Aussenbahn bleibt frei, die andere Aussenbahn wird mit der Testlösung, die daran anschliessende, innere Bahn mit der Untersuchungslösung besetzt. Zwischen diesem sogenannten Teststreifen, der für sich entwickelt wird und den Bahnen, die quantitativ ausgewertet werden sollen, bleibt wieder eine Bahn frei[4].

Störungen der Papierchromatographie von Phosphorverbindungen

Eine ganze Reihe störender Effekte machen sich in der Papierchromatographie von Phosphorverbindungen bemerkbar.

(a) Überladen der Flecke (overloading)[12,13]
(b) Streifenbildung (streaking)
(c) Verzögerungsschatten (lagging shadows)[14]
(d) Schwänze (tailing)
(e) Doppelflecke, Mehrfachflecke (multiple zones)
(f) Hemmung, Verbleiben am Start.

Zu (*a*). Ionische Substanzen dürfen nur bis zu einer gewissen, individuell verschiedenen Menge aufgetragen werden, sonst treten Störungen durch den Überladungseffekt auf. Man nimmt an, dass über die Laufstrecke des Chromatogramms in der Laufrichtung ein kontinuierlicher Abfall des Wassergehalts auftreten müsste[15]. Eine hohe Ionenkonzentration an irgend einer Stelle bringt nach dieser Auffassung einen höheren Wassergehalt an dieser Stelle und eine veränderte Verteilung mit sich. Die R_F-Werte liegen in diesem Falle zu hoch. Der untere Rand des Flecks entspricht der normalen Wanderung, während der Schwerpunkt und die obere Grenze stark variieren können[16]. Wenn der Wassergehalt kontinuierlich abnimmt, kann man verstehen, dass schwerer lösliche Salze allmählich ausfallen und damit Streifenbildung einsetzt.

Streifenbildung ergibt sich auch, wenn das Lösungsmittel zu schnell wandert und es nicht zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichts kommt.

Ein weiterer Überladungseffekt tritt auch bei nichtionisierten Substanzen auf[12]. Das wandernde Lösungsmittel kann die aufgetragenen Substanzen nur bis zu einer bestimmten Konzentration mit sich führen. Wird diese Konzentration überschritten, so bleibt die überschüssige Substanz zurück und bildet "Schatten" aus.

Störungen, die durch Ionen verursacht werden. Die oben beschriebenen störenden Effekten können aber auch von der Einwirkung mehrwertiger Ionen herrühren.

Das gewöhnliche Bild der von Fremdionen verursachten Störungen sind verwaschene, schlecht getrennte Flecke, die meistens irgendwie deformiert sind (Hufeisen etc.). Wahrscheinlich gehen auch die Aufspaltungen der Flecke auf diese Ursache zurück. Störende Kationen treten (1) als Spuren im Papier, (2) als Lösungsmittelgenossen der Phosphorverbindungen oder (3) als Kationen der Phosphate auf. Zur Entfernung störender Ionen im Papier wird das Papier—meist mit Säurezusatz—

Literatur S. 409/410.

gewaschen. Bei Säurezusätzen wird nachgewaschen, bis keine Säure mehr nachgewiesen werden kann. Gegen Schwermetallspuren wird H_2S-Zusatz im Chromatographiergefäss oder das Waschen des Papiers mit einem Komplexbildner empfohlen[14]. Bei der Verwendung von Whatman-Papieren kann auf ein Auswaschen mit 8-Oxychinolinlösung[14,17] oder Versene (Äthylendiamintetraessigsäure)[18] nicht verzichtet werden.

EGGLESTON UND HEMS fügen auch dem Lösungsmittel etwas Versene bei[18].

Fremdionen als Lösungsmittelgenossen der Phosphate sind eine häufige Erscheinung sowohl bei Analysen technischer Produkte (Seifen, Waschmittel) als auch bei der Aufarbeitung biologischen Materials. Eine Behandlung mit Kationenaustauschern entfernt störende Kationen und führt die Substanzen in die Alkalisalze über. Wo die Behandlung mit Ionenaustauschern nicht angebracht erscheint, kann der Lösung eine Spur eines Komplexbildners (Natriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure, Pyridin-Äthylendinitrilotetraessigsäure)[19] zugesetzt werden. Allerdings setzt man damit die R_F-Werte von Estern herab. Nach GORDON *et al.*[12] gibt man nach dem Auftragen der Substanz abschliessend Pyridinsulfatlösung auf den Auftragefleck (overspotting). Die Sulfationen halten mehrwertige Kationen fest und beeinflussen im übrigen die Wanderung der Anionen nicht.

Entwickeln der Chromatogramme

Nach dem Herausnehmen aus dem Lösungsmittel werden die Chromatogramme an der Luft getrocknet und anschliessend einige Minuten bei 60–70° im Trockenschrank[7].

1. *Standardverfahren nach* HANES UND ISHERWOOD[14]

Für alle Arten von Phosphorverbindungen hat sich als Entwickler das Ammonmolybdatreagens nach HANES UND ISHERWOOD durchgesetzt:

5 ml 60% Perchlorsäure, 10 ml 1 *N* HCl und 25 ml 4% Ammonmolybdatlösung werden gemischt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Nach dem Sprühen trocknet man in einem warmen Luftstrom und hängt dann das Chromatogramm 10 Minuten in einen Trockenschrank bei 85°.

Wir liessen Chromatogramme von Phosphorsäureestern und ähnlichen Verbindungen bei Raumtemperatur trocknen und erhitzten dann 7 min auf 70°. Nach unseren Erfahrungen ist eine völlige Hydrolyse bei dieser Trocknung eher gewährleistet, als beim raschen Wegtrocknen des Wassers.

Der Nachteil dieses Standardentwicklers liegt in seiner zerstörenden Wirkung auf das Papier, die von dem Gehalt an Perchlorsäure herrührt. Schon nach einigen Tagen beginnt das Papier zu zerfallen. Immerhin kann man die Chromatogramme, falls man keine photographische Dokumentation anwenden will, auf Papier aufgeklebt mehrere Monate verhältnismässig unversehrt aufbewahren. Um ein Nachbläuen des Chromatogramms zu verhindern, bewahrt man die Chromatogramme besser im Dunkeln auf. SANSONI hat der Anfärbung von Phosphaten auf Filterpapier eine Studie gewidmet, die Untersuchungen über die Wirksamkeit des Ammonmolybdatreagens bei wechselnder Konzentration der Bestandteile enthält[20]. SANSONI empfiehlt ein Gemisch aus 1 Vol. wässr. 5% $HClO_4$ und 1 Vol. wässr. 1% Ammonmolybdatlösung.

Literatur S. 409/410.

Für chromatographische Reihenuntersuchungen wird das Ammonmolybdatreagens auch mit Salpetersäure als hydrolysierender Säure angewandt.

Nach PFRENGLE[4] wird das Reagens folgendermassen hergestellt:

20 g Ammonsulfat, gelöst in 160 ml Wasser werden mit 60 ml konz. HNO_3 ($d = 1.4$) versetzt. Dann bereitet man eine Lösung aus 60 g Ammonmolybdat in 160 ml Wasser von 50°, lässt abkühlen und giesst unter Rühren langsam in die Salpetersäurelösung ein.

Zur photographischen Dokumentation vergleiche [20].

Sichtbarmachung der Flecke

Die Anfärbung der Phosphorverbindung beruht auf der Reduktion der gebildeten Molybdophosphatkomplexe. Phosphorhaltige Substanzen erscheinen dann als blaue Flecke. Diese Reduktion wird von fast allen gebräuchlichen Reduktionsmitteln bewirkt.

(*a*) *Photoreduktion*[21]. Nach Untersuchungen von SANSONI[20] erreicht die Empfindlichkeit der Sichtbarmachung mit UV-Licht oder intensivem Sonnenlicht die gleiche Grenze (0.14 γ/cm² für $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) wie mit H_2S. Es ist leichter, gleichbleibende Bedingungen einzuhalten und Ergebnisse zu reproduzieren, wenn man photochemisch reduziert. Nach unseren Erfahrungen kann man Chromatogramme durch Liegenlassen im Sonnenlicht einwandfrei entwickeln. Das oft beobachtete Deutlicherwerden der Chromatogramme, wenn man sie nach der chemischen Reduktion dem Licht aussetzt, beruht auf der gleichen Wirkung.

Nach CROWTHER[13] genügt es, das Chromatogramm eine Minute lang mit einer kräftigen UV-Lampe zu bestrahlen.

(*b*) *Reduktion mit H_2S.* In der Literatur wird empfohlen, das Chromatogramm nach der dem Sprühvorgang angeschlossenen Trocknung kurze Zeit mit Wasserdampf zu behandeln[22]. Bei anorganischen Phosphaten und leicht hydrolysierenden organischen Phosphorverbindungen erübrigt sich diese Behandlung.

Man lässt das Chromatogramm 5–10 min in der H_2S-Atmosphäre. Der Untergrund soll dann, wenn der Entwickler noch einwandfrei war, weiss oder leicht bräunlich sein. Man muss die Reduktion mit H_2S-Gas überwachen und das Chromatogramm aus der H_2S-Atmosphäre entfernen, bevor sich der Untergrund zu bläuen beginnt. Die beiden Verfahren werden in der qualitativen Chromatographie bevorzugt angewandt.

(*c*) *Reduktion mit aufgesprühten Reduktionsmitteln.* LEUTHARD UND TESTA[23] verwenden in der Chromatographie von Zuckerphosphaten 0.1% Ascorbinsäurelösung als Reduktionsmittel. Vgl. GANGULI[24].

WESTMAN, SCOTT UND PEDLEY berichten über Versuche mit $SnCl_2$-Lösung[25]. Auch Hydrazinhydrochlorid kann als Reduktionsmittel verwendet werden.

In der industriellen Reihenanalyse empfiehlt PFRENGLE[4] ein Reduktionsmittel, das auch für die quantitative colorimetrische Bestimmung geeignet ist:

28.8 g $Na_2S_2O_5$ wasserfrei, 1.05 g Na_2SO_3 wasserfrei, 0.21 g Photorex (Monomethyl-*p*-aminophenolsulfat) werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Diese Verfahren dienen vorwiegend zur quantitativen, colorimetrischen Bestimmung.

Die Bedenken richten sich gegen ein Verwaschen der Flecke, wie es bei mehrmaligem Sprühen doch auftreten kann.

Literatur S. 409/410.

2. Eine Variante der Ammonmolybdatmethode

wurde von VELLUZ UND PESEZ[26] vorgeschlagen:

Das getrocknete Papier wird mit einer salpetersauren Lösung von Ammonmolybdat besprüht, die ein wenig basisches Chininsulfat enthält. Nach der Trocknung bei 80° wird im UV-Licht untersucht. Chininphosphormolybdat bildet einen dunklen Fleck auf blau fluoreszierenden Grund.

3. *Verfahren nach* WADE UND MORGAN[27]

(*a*) Einen grundsätzlichen anderen Weg um Phosphate sichtbar zu machen schlagen WADE UND MORGAN ein. Freie Eisen-(III)-ionen werden von Phosphorsäure-estern komplex gebunden. Nicht komplex gebundene Eisenionen gehen nachher beim Sprühen mit einer Sulfosalicylsäurelösung eine hellpurpurfarbene Komplexverbindung ein.

Man sprüht das Papier mit einer 0.1% $FeCl_3$-Lösung in 80% Äthanol, trocknet bei Raumtemperatur und sprüht erneut mit einer 1% Sulfosalicylsäurelösung in 80% Alkohol. Nach dem Trocknen erscheinen Phosphate als weisse Flecke auf hell purpurfarbenem Untergrund.

Das Verfahren eignet sich nur bei Anwendung saurer Lösungsmittel.

(*b*) Das WADE–MORGAN-Verfahren wird in etwas abgewandelter Form in neuester Zeit empfohlen:

Nach RUNECKLES UND KROTKOV[28] taucht man die getrockneten Papiere in ein Badgemisch von 1.5 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 3 ml 0.3 *N* HCl und 970 ml Aceton, trocknet im Abzug und taucht erneut in eine Lösung aus 12.5 g Sulfosalicylsäure in 1000 ml Aceton.

(*c*) Wenn man nach MAIR-WALDBURG[11] mit butylalkoholischer Eisen-(III)-rhodanidlösung arbeitet (2 Vol. 0.1% $FeCl_3$-Lösung, 1 Vol. 1% NH_4SCN-Lösung wird mit 3 Vol. destilliertem Butanol geschüttelt; die Butanolphase wird verwendet) kommt man mit einer Sprühung aus.

(*d*) SHINAGAWA u. Mitarbeiter[29] sprühen zunächst mit 0.01–0.005 *M* Eisen-(III)-chloridlösung und dann mit 0.01–0.05 *M* Cyanoferrat-(II)-lösung. Auf dem Papier bildet sich Berliner Blau aus, ausser an den Phosphatflecken, die ungefärbt oder in anderen Farben erscheinen.

Zur Chromatographie ^{32}P indizierter Phosphate

Die radioaktiv markierten Substanzen werden zunächst nach Vorschrift papierchromatographisch oder elektrochromatographisch[30] getrennt. Auf dem Papier lassen sich dann die radioaktiven Flecke nach zwei Methoden bestimmen:

(*a*) Durch Autoradiographie;
(*b*) Nach der Auszählungsmethode.

Autoradiographie

^{32}P sendet eine relativ energiereiche β-Strahlung aus. Eine photographische Platte, die in direkten Kontakt mit dem radioaktiv indizierten Chromatogramm gebracht wird, schwärzt sich an den Stellen, die ^{32}P oder ein anderes, markiertes Element aufweisen.

Literatur S. 409/410.

Die Autoradiographie ist eine vorwiegend qualitative Methode, da die Schwärzung der Emulsion der Isotopenmenge nicht proportional ist und die Emulsion nicht linear mit der eingestrahlten Energie geschwärzt wird[31]. Bei der Autoradiographie mit ^{32}P können nur etwa 30% der Aktivität der Flecken nachgewiesen werden[32].

Auszählungsmethode

Die Auszählungsmethode steht heute im Vordergrund, da sie einwandfreie, quantitative Bestimmungen ermöglicht. Bei der Erforschung des Intermediärstoffwechsels wird die Autoradiographie, die keinerlei technischen Aufwand erfordert, mit grossem Erfolg angewandt. Über Einzelheiten unterrichtet SANWAL[33] in *Papierchromatographie in der Botanik.*

B. DIE PAPIERCHROMATOGRAPHIE ANORGANISCHER PHOSPHORVERBINDUNGEN

1. *Die kondensierten Phosphate*

Die Papierchromatographie der kondensierten Phosphate wurde von EBEL in Frankreich, WESTMAN u. Mitarbeitern in Kanada und ANDO u.a. in Japan unabhängig voneinander entwickelt. Sie stellt zusammen mit der Ionenaustauschchromatographie das bevorzugte analytische Verfahren dar.

Aus den Anfängen heraus hat die Methode verschiedene analytische Aufgaben recht überzeugend gelöst:

(*a*) Die Prüfung der in der Literatur beschriebenen kondensierten Phosphate auf ihre Einheitlichkeit und ihre Klassifizierung.

(*b*) Die Identifizierung von Reaktionsprodukten.

(*c*) Die Analyse technischer Produkte (Enthärter, Waschmittel, Lebensmittelzusätze, Gerbereihilfsmittel).

Einen Überblick über die Methode bietet die Monographie von THILO UND GRUNZE *Die Papierchromatographie der kondensierten Phosphate*[7]. Die von THILO UND GRUNZE[7] beschriebene Arbeitsweise darf gegenwärtig als Standardvorschrift gelten, wenn auch laufend Verfeinerungen und Abänderungen der Methode beschrieben werden.

Papier

Einen Überblick über verwendete Papiere und ihre Vorbehandlung gibt Tabelle I. Gegenwärtig besteht eine gewisse Tendenz zu härteren Papiersorten, beispielsweise Schleicher u. Schüll 2045b, überzugehen[38]. Gegen das Schrumpeln der Papiersorten nach dem Waschen wird ein anschliessendes Waschen mit 95% Alkohol empfohlen[28].

Arbeitweise für Testgemische und Substanzen

Die Substanzen werden an Startpunkten auf einer Startlinie aufgetragen, die sich in 3.5–5 cm Abstand vom eintauchenden Ende des Papiers befindet. Die Startlinie wird hoch, aber auf jeden Fall in den geschnittenen Teil des Chromatogramms gelegt, weil die R_F-Werte zwar etwas kleiner, die Trennungen aber sauberer werden[7].

Literatur S. 409/410.

Nachweisempfindlichkeit

Die untere Grenze der Nachweisempfindlichkeit dürfte bei dem von SANSONI[20] angegebenen Wert von 0.14 γ/cm² für $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ liegen.

In der Praxis der Chromatographie wird die Grenze der Nachweisempfindlichkeit

TABELLE I

Papier	*Literatur*	*Vorbehandlung*
Schleicher u. Schüll 2040a	THILO UND GRUNZE[7]	Von der Lieferfirma mit verd. Salzsäure und dest. Wasser gewaschen.
Schleicher u. Schüll 589	CROWTHER[13]	Unvorbehandelt. S. u. S. 589 Schwarzband, rasche Trennung der Phosphate, aber Gefahr der Überladung. S. u. S. 589 Orangeband, langsameres Arbeiten aber weniger Störungen.
Whatman No. 1	WESTMAN *et al.*[25]	Mehrtägiges Waschen mit Essigsäure und Nachwaschen mit dest. Wasser bis zur völligen Acetatfreiheit.
Whatman No. 1 Whatman No. 4	EBEL *et al.*[34–37]	Waschen mit alkoholischer 8-Oxychinolinlösung, anschliessend mit wässr. Alkohol, 2 *N* Essigsäure und destill. Wasser.

zwischen 0.4 und 2 γ P auf den einzelnen Phosphatfleck, entsprechend zwischen 0.15 und 0.66 γ Phosphor pro cm² Fleckengrösse angegeben[4, 34–37].

Testlösungen und Substanzen[2, 7]

Zu der Herstellung von Testlösungen verwendet man ausschliesslich die Natriumsalze. Wenn die Möglichkeit dazu besteht, wendet man auch bei den zu untersuchenden Substanzen die Natriumsalze an. Unlösliche Calciumphosphate werden durch Behandlung mit Versene in Lösung gebracht[2].

Die Testlösungen und dementsprechend auch die Untersuchungslösungen werden allgemein so eingestellt, dass sie 0.1% (bis 1%) an Phosphor enthalten.

Zum Beispiel verwendet man als Pyrophosphatstandard eine Lösung von 0.7 g $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ in 100 ml Wasser gelöst, von der 0.001 ml–0.01 ml entsprechend 1–10γ P mit einer Mikropipette[10] aufgetragen werden.

Nach KARL-KROUPA[2] liegt die Kapazität des Chromatographiepapiers (Schleicher u. Schüll 589) für kurze Laufzeiten bei einem Gesamtgehalt von 10 γ P pro Auftragfleck. Auch bei den zu untersuchenden Phosphatgemischen sollen die aufgetragenen Mengen gering gehalten werden, um auf dem Chromatogramm kleine, gut gegeneinander abgesetzte Flecke zu erhalten.

Man kommt, auch bei Anwesenheit mehrerer Komponenten im Gemisch, mit Lösungen, die 10–20 mg Phosphatgemisch pro ml Wasser enthalten, aus. Davon werden wieder 0.001–0.01 ml aufgetragen.

Analytische Grenzen der Methode

Die Gruppe der kondensierten Phosphate umfasst Substanzen vom Kondensationsgrad $n = 1$ (Orthophosphat) bis zum Kondensationsgrad 10^6 (Kurrol'sches Kaliumsalz). Sie schliesst die ringförmigen Metaphosphate (Tri- und Tetrametaphosphat), die

kettenförmigen Oligophosphate (Kondensationsgrad 4–10) und die Polyphosphate ein.

Diese analytische Aufgabe kann nur durch Verwendung von Gruppenlösungsmitteln, die in einem bestimmten R_F-Bereich die Phosphate als Individuen oder als Gruppen mit einem mittleren Kondensationsgrad auftrennen, gelöst werden.

Aus den bisherigen Erfahrungen geht hervor, dass auch bei sorgfältiger Vermeidung der in Abschnitt A aufgeführten Fehlermöglichkeiten die R_F-Werte nicht immer exact reproduzierbar sind[2,4]. Nach einem Vorschlag von MORTIMER[39] wählt man als Bezugsgrösse nicht mehr die Strecke, die die Lösungsmittelfront zurücklegt, sondern die Strecke, die eine bestimmte Substanz (Orthophosphat) vom Auftragfleck aus zurücklegt.

Dieser sogenannte P_K-Wert (position constant) ist definiert:

$$P_K = \frac{\text{Von der Verbindung zurückgelegter Weg}}{\text{Vom Orthophosphat zurückgelegter Weg}} \times 100$$

Die THILO*'sche Beziehung*[7]. Trägt man die P_K-Werte der einzelnen kondensierten Phosphate (die Beziehung gilt nur für lineare Phosphate) auf gegen ihren Kondensationsgrad n (Zahl der P-Atome im Molekül), so erkennt man, dass die P_K-Werte mit steigendem Kondensationsgrad exponentiell abfallen. Dann liegen die Logarithmen der P_K-Werte, aufgetragen gegen die Zahl der P-Atome im Molekül auf einer Geraden, die der Formel genügt:

$$\log P_K = -an + b \qquad \text{(THILO'sche Beziehung)}$$

n = Kondensationsgrad, a und b sind charakteristische Lösungsmittelkonstanten.

Die THILO'sche Beziehung gilt mit veränderten Konstanten natürlich auch für die R_F-Werte.

Dem exponentiellen Abfall der P_K-Werte entspricht das Bild, das die kondensierten Phosphate im Chromatogramm bieten: In der Gegend des Startpunkts drängen sich die höherkondensierten Phosphate zusammen. THILO hat daher eine praktische Grenze der Wanderung definiert[7]. Die nach der THILO'schen Beziehung gewonnenen Geraden werden auf einen Wert $\log P_K = 0$, d.h. den Schnittpunkt mit der Abzisse, die ja den Kondensationsgrad bezeichnet, extrapoliert. An dieser Stelle ist der P_K-Wert = 1, d.h. die Substanz dieses Kondensationsgrades legt gerade ein Hundertstel der Orthophosphatstrecke zurück, wandert also praktisch nicht mehr.

Nicht alle angegebenen Lösungsmittel für kondensierte Phosphate genügen der THILO'schen Beziehung. Vgl. Fig. 2.

Standardgemische nach THILO[7]

Saures Lösungsmittel I von EBEL[37]; pH = 1.5, Konstante a = 0.20. Standardgemisch zur Trennung niedermolekularer Poly- und Metaphosphate bis zum Tetrameren:
75 ml Isopropanol, 25 ml Wasser, 5 g Trichloressigsäure, 0.3 ml Ammoniak (20%).
Bedingungen: Aufsteigend, Temperatur 16°, 14 Stunden.

Trennleistung: Die Wanderung hört — nach der THILO'schen Festsetzung — bei einem Kondensationsgrad von ungefähr 11 P-Atomen auf. Die ersten sechs Glieder der kondensierten Phosphate besetzen 90% der vom Monophosphat durchlaufenen Strecke (P_K = 10–100). 9% der restlichen Strecke nehmen die Phosphate P_7–P_{11} ein.

Alle höherkondensierten Phosphate befinden sich in dem restlichen Prozent der Strecke. Im vorliegenden Fall entspricht einem Unterschied der P_K-Werte von 4.8 gerade ein Fleckenabstand von 1 cm. Die 5 Polyphosphate im P_K-Bereich 1–10 lassen sich also bereits nicht mehr definitiv trennen.

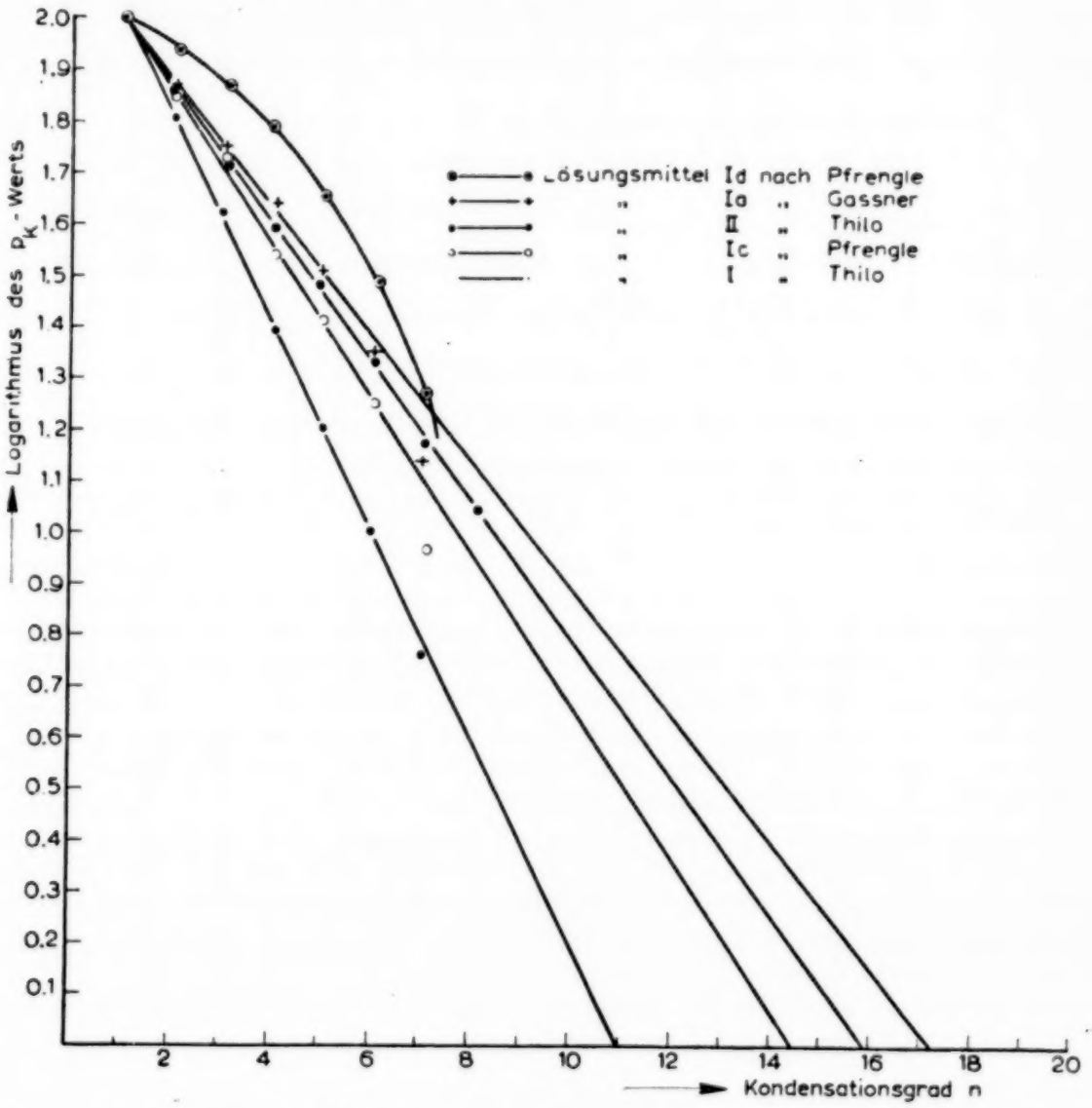


Fig. 2. Die THILO'sche Beziehung für einige Lösungsmittel (siehe Tabelle II).

TABELLE II

	L.M. I nach THILO		*L.M. II nach* THILO		*L.M. Ia* GASSNER		*L.M. Ic* PFRENGLE		*L.M. Id* PFRENGLE	
	P_K-*Wert*	*log*	P_K-*Wert*	*log*	P_K-*Wert*	*log*	P_K-*Wert*	*log*	P_K-*Wert*	*log*
Monophosphat $(PO_4)^{-3}$	100	2.000	100	2.000	100	2.000	100	2.000	100	2.000
Diphosphat $(P_2O_7)^{-4}$	63.8	1.805	72.6	1.861	73.7	1.867	71	1.851	86	1.934
Triphosphat $(P_3O_{10})^{-5}$	42.0	1.623	53.4	1.727	56.2	1.750	54	1.732	74	1.869
Tetraphosphat $(P_4O_{13})^{-6}$	24.6	1.391	39.7	1.599	43.7	1.640	35	1.544	60	1.778
Pentaphosphat $(P_5O_{16})^{-7}$	15.9	1.201	30.1	1.478	32.5	1.512	26	1.413	45	1.653
Hexaphosphat $(P_6O_{19})^{-8}$	10.1	1.004	21.9	1.340	22.5	1.352	18	1.255	31	1.491
Heptaphosphat $(P_7O_{22})^{-9}$	5.8	0.763	15.1	1.179	13.7	1.138	12.5	1.096	19	1.278
Oktaphosphat $(P_8O_{25})^{-10}$			11.0	1.041						

Literatur S. 409/410.

TABELLE III

R_F-WERTE VON KONDENSIERTEN PHOSPHATEN

	L.M. I R_F	*L.M. II* R_F	*L.M. Ia* R_F	*L.M. Ib* R_F	*L.M. Ic* R_F	*L.M. Id* R_F	*L.M. III* R_F	*L.M. IV* R_F
Monophosphat $(PO_4)^{-3}$	0.69	0.73	0.80	0.79	0.70	0.79	0.33	0.41
Diphosphat $(P_2O_7)^{-4}$	0.44	0.53	0.59	0.62	0.50	0.68	0.24	0.31
Triphosphat $(P_3O_{10})^{-5}$	0.29	0.39	0.45	0.53	0.38	0.58	0.24	0.31
Tetraphosphat $(P_4O_{13})^{-6}$	0.17	0.29	0.35	0.49	0.25	0.47	(0.20)	(0.26)
Pentaphosphat $(P_5O_{16})^{-7}$	0.11	0.22	0.26	0.44	0.18	0.36	—	—
Hexaphosphat $(P_6O_{19})^{-8}$	0.07	0.16	0.18	0.32	0.13	0.25		
Heptaphosphat $(P_7O_{22})^{-9}$	0.04	0.11	0.11	—	0.09	0.15		
Oktaphosphat $(P_8O_{25})^{-10}$	—	0.08	—	—	—	—		
Trimetaphosphat $(P_3O_9)^{-3}$	0.20	0.32			0.21	0.39	0.53	0.64
Tetrametaphosphat $(P_4O_{12})^{-4}$	0.08	0.18			0.13	0.22	0.40	0.50

L.M. I = Lösungsmittel nach EBEL[37], R_F-Werte nach THILO[7]: 75 ml Isopropanol, 25 ml Wasser, 5 g Trichloressigsäure, 0.3 ml Ammoniak (20%).

L.M. II = Lösungsmittel nach THILO[7]: 70 ml Isopropanol, 10 ml Wasser, 20 ml 20% Trichloressigsäure, 0.3 ml Ammoniak (25%).

L.M. Ia = Lösungsmittel nach GASSNER[40]: 80 ml Isopropanol, 5 g Trichloressigsäure, 0.3 ml Ammoniak (25%), 40 ml Wasser, 40 ml Äthylenglykolmonomethyläther.

L.M. Ib = Lösungsmittel nach GASSNER[40]: 80 ml Isopropanol, 5 g Trichloressigsäure, 0.3 ml Ammoniak (25%), 70 ml Wasser, 20 ml Äthylenglykolmonomethyläther, 40 ml Dioxan.

L.M. Ic = Lösungsmittel nach PFRENGLE[4]: 26.25 ml Isopropanol, 13.75 ml Wasser, 15.6 g Trichloressigsäurelösung (bestehend aus 20 g Trichloressigsäure, 5.5 ml Ammoniak (d = 0.918) mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt), 3 ml Essigsäure (aus 20 ml 96% Essigsäure und 80 ml Wasser), 30 ml Dioxan.

L.M. Id = Lösungsmittel nach PFRENGLE[4]: 60 ml Methanol, 10.3 ml Trichloressigsäurelösung (100 g Trichloressigsäure auf 500 ml verdünnt und mit 22.7 ml Ammoniak (d = 0.918) versetzt), 5 ml Essigsäurelösung (20 ml 96% Essigsäure und 80 ml Wasser).

L.M. III = Lösungsmittel nach EBEL[34], R_F-Werte nach THILO[7]: 40 ml Isopropanol, 20 ml Isobutanol, 39 ml Wasser, 1 ml Ammoniak (25%).

L.M. IV = Lösungsmittel nach EBEL[37], R_F-Werte nach THILO[7]: 30 ml Isobutanol, 30 ml Äthanol abs., 39 ml Wasser, 1 ml Ammoniak (25%).

Saures Lösungsmittel II von THILO[7]; pH = 1.7, Konstante a = 0.136. Standardgemisch zur Trennung niedermolekularer und höherkondensierter Oligomeren gleichzeitig:

70 ml Isopropanol, 10 ml Wasser, 20 ml 20% Trichloressigsäure, 0.3 ml Ammoniak (25%).

Bedingungen: Aufsteigend, Temperatur 16°, 14 Stunden.

Trennleistung: Bei einem Kondensationsgrad n = 16 bleibt die Wanderung aus. Die R_F-Werte verteilen sich gleichmässiger als bei Gemisch I. Die ersten acht Glieder im P_K-Bereich 10–100 werden einwandfrei getrennt, während die im P_K-Gebiet 1–10 liegenden Polyphosphate P_8–P_{16} nicht einwandfrei erkannt werden.

Die ringförmigen Metaphosphate können mit Lösungsmittel I und II nur in Abwesenheit höherer kondensierter Phosphate nachgewiesen werden.

Saures Lösungsmittel Ia nach GASSNER[40]; pH = 1.7. Entspricht dem Gemisch I nach THILO:

80 ml Isopropanol, 40 ml Wasser, 5 g Trichloressigsäure, 0.3 ml Ammoniak (25%), 40 ml Äthylenglykolmonomethyläther.

Bedingungen: Aufsteigend, Temperatur 12°, 30 Stunden.

Trennleistung: Extrapolierter Kondensationsgrad, bei dem keine Wanderung mehr stattfindet = 17.

Literatur S. 409/410.

Das Gemisch nach GASSNER[40] erreicht die gegenwärtig höchste Trennleistung. In einem Polyphosphatglas mit einem Gesamt-P_2O_5-Gehalt von 62%, entsprechend einem ungefähren mittleren Kondensationsgrad P_5, konnten in einem Ringchromatogramm 12 Zonen, d.h. P_{11} und P_{12} unterschieden werden.

Saures Lösungsmittel Ib nach GASSNER[40]; pH = 1.7. Dieses "Dioxangemisch" dient zur möglichst weitgehenden Auftrennung von Oligo- und Polyphosphatgruppen:

80 ml Isopropanol, 70 ml Wasser, 5 g Trichloressigsäure, 0.3 ml Ammoniak (25%), 20 ml Äthylenglykolmonomethyläther, 40 ml Dioxan.

Bedingungen: Aufsteigend, Temperatur 12–14°, 18–20 Stunden.

Trennleistung: Auf das Gemisch lässt sich die THILO'sche Beziehung streng genommen nicht anwenden. GASSNER[40] gibt den Grenzkondensationsgrad für die Wanderung mit $n = 20$ an. Die Oligophosphate wandern zum Teil nicht mehr als Individuen; die Oligophosphate und Polyphosphate bis über den Kondensationsgrad $n = 10$ hinaus verteilen sich sehr gleichmässig über eine Strecke von 20–30 cm.

Saures Lösungsmittel Ic nach PFRENGLE[4]. Dieses "Dioxangemisch" entspricht etwa Lösungsmittel I:

26.25 ml Isopropanol, 13.75 ml Wasser, 15.6 g Trichloressigsäurelösung (bestehend aus 20 g Trichloressigsäure, 5.5 ml Ammoniaklösung ($d = 0.918$) mit destilliertem Wasser auf 100 ml gefüllt), 3 ml Essigsäure (aus 20 ml 96% Essigsäure und 80 ml Wasser), 30 ml Dioxan.

Bedingungen: Aufsteigend, Temperatur 18–20°, 16–17 Stunden.

Trennleistung: Extrapolierter Kondensationsgrad, bei dem Wanderung unterbleibt ist 14. Die Strecken, die Monophosphat im Lösungsmittel I nach THILO und im Lösungsmittel Ic nach PFRENGLE in etwa der gleichen Zeit zurücklegt, verhalten sich annähernd wie 3:5. Das bedeutet, da im übrigen die P_K-Werte ähnlich liegen, eine günstige Verteilung der Phosphate über eine grössere Strecke.

Saures Lösungsmittel Id nach PFRENGLE[4]; "Methanolgemisch". Ein sehr schnell laufendes Gemisch zur qualitativen Orientierung:

60 ml Methanol, 10.3 ml Essigsäurelösung (100 g Trichloressigsäure auf 500 ml verdünnt und mit 22.7 ml Ammoniak ($d = 0.918$) versetzt), 5 ml Essigsäurelösung (20 ml 96% Essigsäure und 80 ml Wasser).

Bedingungen: Aufsteigend, Temperatur 20°, 4 Stunden.

Trennleistung: Die THILO'sche Beziehung lässt sich auf das Gemisch nicht anwenden. Die P_K-Werte sind fast äquidistant über die ganze Strecke verteilt. Auch eine Trennung der Metaphosphate von den Oligophosphaten ist möglich. Die auftretenden Verzögerungsschatten beeinträchtigen eine qualitative Auswertung nicht nennenswert.

Die Gefahr der Hydrolyse der kondensierten Phosphate besteht bei Lösungsmitteln mit so kurzer Laufzeit in geringerem Masse.

Ammoniakalische Standardlösungsmittel nach THILO[7]. Mit den ammoniakalischen Lösungsmitteln sollen besonders Trimeta- und Tetrametaphosphate in Gegenwart von Polyphosphaten erfasst werden.

Ammoniakalisches Lösungsmittel II nach EBEL[34].

40 ml Isopropanol, 20 ml Isobutanol, 39 ml Wasser, 1 ml Ammoniak (25%).

Bedingungen: Aufsteigend, Temperatur 16°, 16 Stunden.

Trennleistung: Tri- und Tetrametaphosphat wandern am schnellsten (P_K-Werte

160 u. 125). Die Trennung von Ortho- und polymerem Phosphat ist gut. Di-, Tri- und Tetraphosphat lassen sich für eine Identifizierung nicht genügend unterscheiden.

Mit diesem Lösungsmittel gelang REMY[41] der chromatographische Nachweis des Phosphorigphosphats $Na_3HP_2O_6$ ($R_F = 0.49$, $P_K \sim 110$).

Ammoniakalisches Lösungsmittel IV von EBEL[37].

30 ml Isobutanol, 30 ml Äthanol abs., 39 ml Wasser, 1 ml Ammoniak (25%).

Bedingungen: Aufsteigend, Temperatur 16°, 16 Stunden.

CROWTHER[13] verwendet ein Gemisch von *n*-Propanol–Ammoniak–Wasser (60:20:20) V/V.

Bedingungen: Absteigend, Raumtemperatur, 48 Stunden.

Trennleistung: Mit diesem Gemisch soll eine Trennung bis zum Kondensationsgrad $n = 9$ erreicht werden. WESTMAN war damit der chromatographische Nachweis des Tetraphosphats gelungen[42]. Ausser WESTMAN[43] u. Mitarbeiter bevorzugten auch einige andere Autoren die absteigende Methode, da sie gestattet, die gesamte Länge eines Bogens zur Trennung der Substanzen auszunutzen[44].

Zweidimensionale Verfahren

KARL-KROUPA[2] hat das zweidimensionale Verfahren von EBEL[36] für eine saubere Trennung der ringförmigen Metaphosphate und der kondensierten Phosphate ausgearbeitet.

Zunächst werden mit dem ammoniakalischen Lösungsmittel III auf einer Bahn die schneller laufenden Metaphosphate von den anderen Phosphaten getrennt, dann wird mit dieser Bahn als zweiter Grundlinie im nicht beanspruchten Teil des Papiers eine Vergleichslösung aufgetragen und zur Wanderung in der neuen Richtung (im sauren Lösungsmittel) angesetzt.

Man darf nach dem ersten Lauf nur bei Raumtemperatur trocknen, um Hydrolyse möglichst zu vermeiden.

VAN WAZER UND KARL-KROUPA erhielten mit dieser Methode bei Hydrolyseversuchen am GRAHAMschen Salz mehrere deutliche Flecke, die als die lang gesuchten, höheren Metaphosphate (Pentametaphosphat, Hexametaphosphat) gedeutet werden müssen[45].

Zur Entwicklung der Chromatogramme

Es wurden Versuche unternommen, bestimmte Verbindungen selektiv zu entwickeln. Orthophosphat zeigt sofort beim Entwickeln mit dem Ammonmolybdatreagens unabhängig von dem verwendeten Lösungsmittel eine deutliche Gelbfärbung von Molybdophosphat.

Nach der Reduktion (mit beliebigen Reduktionsmitteln) weist Orthophosphat eine grau-grüne Färbung im Unterschied zu den anderen Phosphaten auf[7]. Auch das Phosphorigphosphat zeigt nach REMY[41] im Chromatogramm diese graue Farbe.

Nach einiger Zeit kann auch bei höher kondensierten Phosphaten Gelbfärbung auftreten.

Der gelbe Molybdophosphatkomplex zeigt im UV-Licht eine deutliche Fluores-

zenz, deren Intensitätsmaximum und geometrische Begrenzung sich decken mit der beobachteten Gelbfärbung im sichtbaren Licht. Die anschliessend durch die Reduktion erzeugten Phosphormolybdänblau-Flecke sind häufig verschoben und haben dementsprechend ihre Intensitätsmaxima an anderen Stellen[13].

SANSONI[20] beobachtete, dass in manchen Fällen nur die Ränder des Flecks gefärbt sind, während das Innere weiss bleibt. Bei typischen Verdrängungschromatogrammen konnten wir das Gleiche beobachten. Diese Störung beruht wahrscheinlich auf einer Überladung (overloading) der Stelle, vielleicht mit ganz anderen, chromatographisch nicht erscheinenden Substanzen.

Eine frühere Arbeit von ANDO, ITO, ISHII UND SODA[46], entwickelt in mehreren Stufen: (1) Sprühen mit 4% Lösung von Ammonmolybdat in 8% Salpetersäure und Erhitzen. (2) Sprühen mit 0.05% Lösung von Benzidin in 10% Essigsäure. (3) Einwirkung von Ammoniakdampf. Dabei zeigt Pyrophosphat einen purpurrroten Fleck.

Besondere Bedingungen für die Chromatographie der kondensierten Phosphate. Störungen und ihre Beseitigung

(*a*) *Hydrolyse.* Polyphosphate sind in mässig saurer Lösung beliebig lange Zeit praktisch unverändert beständig[47].

Die Frage, wie weit bei den kondensierten Poly- und Metaphosphaten unter den Bedingungen der Chromatographie sekundäre Veränderungen zu erwarten sind, trat beim Übergang zur quantitativen Methode in den Vordergrund.

Aus quantitativen Untersuchungen an Pyro- und Triphosphaten geht hervor, dass dieselbe Hydrolysengeschwindigkeit eingesetzt werden darf, die in wässrigen Lösungen entsprechender Acidität bzw. Basizität gemessen wurde. Es war deshalb möglich, Hydrolysekorrekturfaktoren, die aus entsprechenden Mess-Daten in wässriger Lösung gewonnen worden waren, in die quantitative Papierchromatographie einzuführen[2].

Die Hydrolyse fällt umsomehr ins Gewicht, je grösser die Laufzeit und je höher die Arbeitstemperatur während des Vorgangs ist. Eine ausserordentliche Zunahme der Hydrolyse kann unter dem katalytischen Einfluss von Verunreinigungen, Mikroorganismen und mehrwertiger Kationen beobachtet werden[2].

Unter der polarisierenden Wirkung der Felder mehrwertiger Kationen können hydrolytische Aufspaltungen und Umwandlungen der kondensierten Phosphate auftreten[48].

(*b*) *Störungen durch Fremdionen.* GASSNER[40] hat den Einfluss von Fremdionen in verschiedenen Konzentrationen auf die Papierchromatographie der kondensierten Phosphate in einer eingehenden Arbeit untersucht.

Es zeigte sich, dass bei fast allen Schwermetallkationen auch in geringen Mengen Störungen der chromatographischen Trennung auftreten. Wahrscheinlich überlagern sich verschiedene Wirkungen, die den Schwermetallionen zukommen (Komplexbildung, Hydrolysebeschleunigung).

Nach früheren Untersuchungen wurde für Oligo- und Polyphosphate Komplexbildung mit Metallen, auch mit den Alkalimetallen nachgewiesen[49].

Heute werden die Erscheinungen, die früher auf die Komplexbildung der Poly-

phosphate ($n > 3$) mit Kationen zurückgeführt wurden, vorwiegend als Ionenaustauschvorgänge gedeutet[47]. Auch bei den Erdalkalikomplexen mit ATP, Fructosephosphat und Glycerophosphat ist der Phosphatrest der komplexbildende Teil des Moleküls[50]. Solche Komplexe lassen einen andersartigen Transportmechanismus erwarten als unchelatisierte Ionen. Die ringförmigen Metaphosphate, die keine Chelatkomplexe ausbilden können[51], bilden viel instabilere Komplexe als die linearen Phosphate. Im Einklang mit dieser Vorstellung beobachtet GASSNER[40] eine Wanderung des Trimetaphosphats, wenn die anderen Phosphate am Start verbleiben (Anwesenheit von Mg^{+2}, Sr^{+2}, Ba^{+2}, Zn^{+2}). Nach unseren Beobachtungen an Silbertrimetaphosphat zeichnet sich nach der Reduktion mit H_2S ein brauner Hof von Silbersulfid in rund 7 cm Abstand vom Start ab, während sich der Trimetaphosphatfleck in einem Abstand von 4.2 cm (entspricht unter normalen Bedingungen einem R_F-Wert von 0.18[7]) befindet.

LEDERER[52] stellte bei Untersuchungen zum chromatographischen Trennungsgang fest, das Orthophosphat neben Fe^{+3}, Cu^{+2} oder UO^{+2} (in Konzentrationen von 10 mg/ml) im Butanol–Salzsäuregemisch ohne nachweisbare Beeinflussung wandert. Das Orthophosphat befindet sich zum Schluss einige cm vor der Front des Eisens.

Allerdings wird radioaktiv markiertes $H_3{}^{32}PO_4$, dessen Menge gravimetrisch nicht mehr erfasst werden kann, bei der chromatographischen Trennung von Fe(III)-ionen etwas zurückgehalten. Sobald mehrwertige Kationen in der Lösung vorhanden sind, verbleibt in der Regel ein mehr oder weniger grosser Teil der Phosphate (speziell am Pyro- und Trimetaphosphat untersucht) am Start[40]. THILO teilt mit, dass auch Ca-Trimetaphosphat und Tetrametaphosphat ähnlich einem hochpolymeren Phosphat am Start sitzen bleiben[53].

Dabei ist keine sekundäre Veränderung des chromatographierten Trimetaphosphats im Spiel, wie THILO durch Ausfällung der Ca-Ionen mit Oxalat und erneute Chromatographie bewiesen hat[53]. Vielleicht wirken die Kationen als Austauschkationen zwischen dem Cellulosesystem mit seinen statistisch verteilten negativen Ladungen[54] und den Phosphateinheiten in Lösung, und vermitteln so die Bindung an das Papier.

Nach GASSNER[40] beseitigt ein Zusatz von Komplexon III (Dinatriumsalz der Aethylendiamintetraessigsäure) die Störungen ganz oder doch teilweise. Der störende Einfluss von Calcium bis zu 16 γ pro Fleck lässt sich durch Komplexonzusatz und anschliessende alkalische Chromatographie ausschalten. Die besten Bedingungen für die Chromatographie werden geschaffen, wenn man die Verbindungen mit Hilfe eines Kationenaustauschers in der Natrium-Form in das Na-Salz der betreffenden Säuren überführt[53]. Nach KARL-KROUPA beseitigt die Behandlung mit Ionenaustauschern Ca-Ionen nicht völlig aus der Lösung[2].

Störende Anionen. Hohe Salzkonzentrationen machen sich allgemein störend bemerkbar[40]. Sulfat, Sulfit und Formiat beeinträchtigen die Trennungen im alkalischen Lösungsmittel, Chromat stört besonders im sauren Chromatogramm.

Arsenat gibt einen blauen bis braunen Fleck in Orthophosphathöhe. Silikate verbleiben im überwiegend organischen Lösungsmittel als blaue reduzierte Siliko–Molybdänkomplexe am Start[55].

Literatur S. 409/410.

Quantitative Papierchromatographie der kondensierten Phosphate

Die quantitative Bestimmung der einzelnen kondensierten Phosphate erfordert eine besonders scharfe Trennung der Komponenten eines Gemischs. Die Flecke müssen so ausgeschnitten werden, dass der ganze Bereich des Flecks mit Sicherheit darin enthalten ist. Man verzichtet daher häufig auf die Einzelbestimmung eines jeden kondensierten Phosphats und trennt in Gruppen eines bestimmten Kondensationsbereichs auf, die in Summa bestimmt werden. Glücklicherweise ist man nicht darauf angewiesen, die Absolutmengen der einzelnen Phosphate zu bestimmen, sondern man benötigt nur das Verhältnis der Phosphatgehalte der einzelnen Flecke und kann aus einer gleichzeitig durchgeführten Gesamtphosphorbestimmung die absoluten Prozentzahlen errechnen.

Fehler, die beim Auftragen der Lösung entstehen, gehen somit nicht in die Bestimmungsmethode ein, da nur die Verhältniszahlen der einzelnen Komponenten bestimmt werden.

Die Wahl des Verfahrens (Vgl. *Die Papierchromatographie der kondensierten Phosphate*) richtet sich nach den analytischen Anforderungen.

Zunächst sollte ein qualitatives Chromatogramm über die Zusammensetzung der Probe Auskunft geben.

Zur Bestimmung geringer Mengen Orthophosphat neben kondensierten Phosphaten führt GASSNER[40] keine papierchromatographische Trennung durch, sondern photometriert das bei pH = 4 mit Ammonmolybdat und Ascorbinsäure erzeugte Phosphormolybdänblau. Eine quantitative Direkt-Auswertung der Phosphatfleckedurch Grössenvergleich oder Photometrierung kommt nicht in Frage, da die auf dem Papier gebildeten blauen Komplexe nicht einheitlich sind[2]. Die quantitative Bestimmung von Phosphorverbindungen schliesst daher notwendig mehrere Schritte ein:

Loslösen der phosphorhaltigen Substanz vom Papier.

Hydrolyse zum Orthophosphat.

Überführung des Orthophosphats in Phosphormolybdänblau durch eine Reduktionslösung.

Colorimetrie.

Im einzelnen bieten sich zwei Wege an.

1. Man entwickelt einen Teststreifen, der mit dem Chromatogramm identisch ist, für sich, schneidet die entsprechenden Flecke im Chromatogramm "blind" aus und bestimmt sie quantitativ nach S. 407[56]. Die Einteilung des Papiers kann nach der Vorschrift S. 392 vorgenommen werden.

Gerade für dieses "Blindverfahren" eignen sich die Lösungsmittel Ic und Ib (S. 401) mit der gleichmässigen Verteilung der Phosphate über die Laufstrecke besonders gut.

KÖBERLEIN UND MAIR-WALDBURG[11], die ringchromatisch arbeiten, kennzeichnen die einzelnen Phosphatringe durch Sprühen mit einer butylalkoholischen Eisenrhodanidlösung (Vgl. S. 395) und schneiden sie aus. Da anwesendes Filterpapier die

Hydrolyse nicht stört[2], führt PFRENGLE[4] das Eluieren und Verkochen zu Orthophosphat in einem einzigen Arbeitsgang durch:

In einem 100 ml Erlenmeyerkölbchen werden die zerschnipfelten Papierzonen mit 50 ml 1 *N* H_2SO_4 über Nacht bei 90° behandelt.

Hochmolekulare Phosphate, die nach dieser Arbeitsweise nicht vollständig erfasst werden, werden 2 Stunden lang am Rückflusskühler gekocht. Nach dieser Behandlung ist vollständige Hydrolyse und Ablösung vom Papier eingetreten. PFRENGLE verwendet die Colorimetrie nach SCHEEL-LEDERLE[57], weil die Lösungen sich längere Zeit verwerten lassen und die Reduktionslösung zum Entwickeln der Testreifen und zur Colorimetrie geeignet ist.

In anderen Arbeiten wird das Papier zunächst mineralisiert und dann die Hydrolyse der Phosphate durchgeführt[11].

2. Die Phosphorverbindungen werden zunächst auf dem Papier mit der Molybdänblau-Methode sichtbar gemacht.

Die ausgeschnittenen Phosphatflecke können nach dem Entwickeln durch *Extraktion* oder durch *Veraschen* des Papiers in Lösung gebracht werden. Nach KING[58] wird das Papier verascht, indem man es in einem Tropfen konz. HNO_3 eine Stunde auf 150° erhitzt (Sandbad). Die völlig klar schimmernde Lösung darf kein NO bzw. NO_2 enthalten, da Spuren dieser Verbindungen die kolorimetrische Bestimmung beeinträchtigen. Anscheinend entstehen beim Veraschen der mit Ammonmolybdatreagenz entwickelten Phosphate Verbindungen, die bei der Colorimetrie zu hohe Werte liefern[11].

Da sich der Molybdänkomplex in saurer Lösung schlecht löst, wird mit verd. Ammoniak extrahiert[2] (gewöhnlich 0.1 *N* Ammoniak). Dann wird mit verd. Perchlorsäure oder 8 *N* Schwefelsäure neutralisiert und zur Hydrolyse mit einem Überschuss der Säure versetzt. THILO und WIEKER[7] neutralisieren gegen *p*-Nitrophenol, bevor der Phosphormolybdänkomplex erzeugt wird, da die Farbtiefe des Phosphormolybdänblaus stark vom pH der Lösung abhängig ist. Die zur Neutralisation verwendete NaOH wird in Vinidur- oder Silbergefässen aufbewahrt, weil grössere Mengen der aus dem Glas sich herauslösenden Kieselsäure zu Fehlern bei der colorimetrischen Phosphorbestimmung führen.

Auf die Eluierung des Komplexes mit Ammoniak kann verzichtet werden, wenn man die colorimetrische Bestimmung unter exakt eingehaltenen Bedingungen für alle anfallenden Phosphatfraktionen einer Analyse durchführt[2]. Bei der Überführung des Molybdophosphatkomplexes in die organische Phase stellt sich allerdings ein Verteilungsgleichgewicht zwischen der wässrigen Phase, dem Cellulosesystem des Papiers und der organischen Phase ein. Es gelingt, den hieraus resultierenden Minusfehler der anschliessenden colorimetrischen Bestimmung des extrahierten Phosphormolybdänkomplexes auszuschalten, in dem man jeweils genau gleich grosse Papierzonen ausschneidet und nach genau dem gleichen Verfahren extrahiert. Die so gewonnenen Verhältniszahlen der einzelnen Phosphatfraktionen lassen sich bei Kenntnis des Gesamtphosphorgehalts der Probe in die absoluten Prozentzahlen umrechnen.

Die Genauigkeit von Bestimmungen ohne anfängliche Extraktion mit Ammoniak ist gerade bei kleinsten Phosphormengen etwas geringer[2].

Literatur S. 409/410.

Die Extraktion des Phosphormolybdänkomplexes mit organischen Solventien (Isobutanol)

bietet den Vorteil, dass die Bestimmung des P-Gehalts nach den optischen Methoden ohne einen wesentlichen Salzfehler, d.h. ohne den Einfluss nicht absorbierender Zusätze auf die Lichtabsorption durchgeführt werden kann[60].

Ausführliche Arbeitsvorschriften werden von WIEKER[7] und KARL-KROUPA[2] angegeben.

Nach THILO UND WIEKER[7] gibt man zum Beispiel:

1. 0.06 ml 10 *N* H_2SO_4
2. 0.25 ml 5% Ammonmolybdatlösung
3. die neutralisierte Untersuchungslösung
4. 5 ml destilliertes Isobutanol

in einen Scheidetrichter und schüttelt mindestens 20 sec lang. Nach dem Abtrennen der wässrigen Phase wird mit 1 ml 1 *N* H_2SO_4 gewaschen.

Für die Reduktion zum Phosphormolybdänblau kommen verschiedene Reduktionslösungen in Frage[61].

(*a*) $SnCl_2$-Lösung verwenden: WIEKER[7], KARL-KROUPA[2], WESTMAN[25], KÖBERLEIN[11].

Die Gebrauchslösung nach WIEKER[7] wird aus 0.25 ml einer Stammlösung (10 g $SnCl_2$ + 25 ml HCl konz.) durch Versetzen mit 25 ml 1 *N* H_2SO_4 täglich frisch bereitet.

(*b*) Reduktion mit Metol (Photorex, Monomethyl-*p*-aminophenolsulfat, vgl. S. 394 nach PFRENGLE[4,57].

(*c*) Reduktion mit Hydrazinhydrochlorid[13].

(*d*) Reduktion mit Ascorbinsäure[44].

Es steht zu erwarten, dass die Ergebnisse kritischer Untersuchungen[62,60] zur Colorimetrie des Phosphors auch die Verfahren der quantitativen Papierchromatographie beeinflussen werden.

Fehlerbreite der quantitativen Methoden

Beim Arbeiten mit Mikrovolumina und gerade beim Aufbringen der Substanzlösungen können beträchtliche Fehler entstehen. Daher umgehen einige neuere Verfahren die Bestimmung von Absolutmengen und ermitteln nur das Verhältnis der Phosphorgehalte der einzelnen Phosphatflecke[2,40]. Die absoluten Prozentzahlen können dann aus der Gesamtphosphorbestimmung der Probe errechnet werden.

Die Mengen der zu bestimmenden Phosphate und damit die absolute Messgenauigkeit sind durch das chromatographische Verfahren festgelegt. Für eine einwandfreie chromatographische Trennung dürfen nicht mehr als 200 γ Phosphat (berechnet als P_2O_5) in dem üblichen Lösungsvolumen von 10 μl aufgebracht werden. Die zulässigen Phosphorkonzentrationen bei der Colorimetrie richten sich nach dem verwendeten colorimetrischen Verfahren. Wenn die Probe hauptsächlich Polyphosphat enthält, das nicht wandert, kann die Einwaage etwas grösser genommen werden; bei der Bestimmung des hochmolekularen Anteils wird dann ein entsprechend geringerer Bruchteil der Lösung colorimetriert. Die gewöhnlichen Einwaagen für chromatographische Analysen entsprechen etwa 100 γ P_2O_5. Setzt man für die photometrische Bestimmung einen absoluten Fehler von 0.5 γ P_2O_5 ein, dann lässt sich die Bestimmung der Phosphatzusammensetzung mit einem absoluten Fehler von $\pm$ 0.5%

durchführen[2,40,13]. Die relativen Fehler steigen bei den Komponenten eines Gemischs, die in geringer Menge vorliegen, entsprechend an.

WIEKER gibt einen maximalen relativen Fehler von 3% an. Der Phosphorgehalt des Chromatographiepapiers kann vernachlässigt werden, wenn er 0.01 γ P/cm^2 nicht überschreitet[7].

Radioaktiv markierte kondensierte Phosphate

Messtechnische Einzelheiten der Auszählungsmethode hat MEISSNER angegeben[63]. Die Grenze der Nachweisempfindlichkeit liegt grössenordnungsmässig bei 10^{-9} g. Zur Aufstellung einer Verteilungskurve bestimmt man mit dem Zählrohr die ^{32}P-Belegung des Chromatographiestreifens und trägt die gemessenen Aktivitäten in Abhängigkeit von der Entfernung vom Startpunkt (bzw. vom R_F-Wert) auf. Die Flächen unter den Maxima der Verteilungskurve sind proportional den hier konzentrierten P-Mengen. Durch eine Kurvenanalyse und Ausplanimetrieren kann man das relative Mengenverhältnis der einzelnen Phosphate unmittelbar festlegen. Zu einer Absolutbestimmung des Phosphors ist es notwendig, eine absolute Eichung der Messapparatur durchzuführen.

Die radioaktive Methode ist ein bevorzugtes Verfahren für Stoffwechseluntersuchungen mit Phosphaten[64].

2. *Phosphor-Sauerstoffverbindungen niederer Wertigkeitsstufen*

Die niederen Sauerstoffsäuren des Phosphors werden nach derselben Methode chromatographiert wie die kondensierten Phosphate. EBEL[37] stellte zunächst fest, dass in dem sauren Lösungsmittel I Hypophosphit, Phosphit, Pyrophosphit und Orthophosphat nicht getrennt werden können; dagegen ist eine Trennung dieser Gruppe von Hypophosphat oder Pyrophosphat möglich. Die Trennung Arsenit–Arsenat gelingt glatt. Auch bei dem von D'AMORE angegebenen Gemisch (70 ml Isobutanol, 6 ml Acetylaceton, 2.5 g Trichloressigsäure, 0.2 ml Ammoniak (d = 0.91), 39 ml Wasser) ist die Trennung unzureichend[65]. Gute Trennungsmöglichkeiten bieten die alkalischen Gemische. So werden die 5 Anionen Hypophosphit, Phosphit, Pyrophosphit, Hypophosphat und Orthophosphat mit dem ammoniakalischen Lösungsmittel IV von EBEL gut getrennt. Die Trennung Arsenit–Arsenat ist allerdings nicht möglich. Auch das ammoniakalische Gemisch III findet Anwendung[65].

BONNIN UND SUE[66] führen Trennungen von Phosphat, Phosphit und Hypophosphit mit einem Gemisch n-Butanol–Dioxan–1 N Ammoniak (1:1:1) durch.

DANK

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Priv. Doz. Dr. F. CRAMER danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit und für seine grosszügige Förderung.

Literatur S. 409/410.

LITERATUR

[1] E. C. BATE-SMITH, *Partition Chromatography, Biochem. Soc. Symposia (Cambridge, Engl.)*, No. 3 (1950) 62.
[2] E. KARL-KROUPA, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1091.
[3] I. W. WARK, *J. Proc. Roy Soc. N.S. Wales*, 63 (1929) 47.
[4] O. PFRENGLE, *Z. anal. Chem.*, 158 (1957) 81.
[5] H. HARTKAMP UND H. SPECKER, *Z. anal. Chem.*, 158 (1957) 92.
[6] F. REINDEL UND W. HOPPE, *Naturwiss.*, 40 (1953) 245.
[7] E. THILO UND H. GRUNZE, *Die Papierchromatographie der kondensierten Phosphate*, Akademieverlag, Berlin, 1955.
[8] W. MATTHIAS, *Naturwiss.*, 41 (1954) 17;
W. MATTHIAS, *Der Züchter*, 24 (1954) 313.
[9] E. SCHWERDTFEGER, *Naturwiss.*, 41 (1954) 18.
[10] F. CRAMER, *Papierchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim, 1958.
[11] W. KÖBERLEIN UND H. MAIR-WALDBURG, *Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch.*, 102 (1955) 231.
[12] H. T. GORDON, W. THORNBURG UND L. N. WERUM, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 849.
[13] J. CROWTHER, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 1383.
[14] C. S. HANES UND F. A. ISHERWOOD, *Nature*, 164 (1949) 1107.
[15] S. N. TEWARI, *Naturwiss.*, 41 (1954) 229.
[16] H. T. GORDON UND C. A. HEWEL, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 1471.
[17] J. P. EBEL, *Bull. soc. chim. France*, 20 (1953) 991.
[18] L. V. EGGLESTON UND R. HEMS, *Biochem. J.*, 52 (1952) 156.
[19] D. G. WALKER UND F. L. WARREN, *Biochem. J.*, 52 (1951) xxi.
[20] B. SANSONI, *Angew. Chem.*, 65 (1953) 423.
[21] R. S. BANDURSKI UND B. AXELROD, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 405.
[22] J. FLECKENSTEIN, *Naturwiss.*, 40 (1953) 462.
[23] F. LEUTHARD UND E. TESTA, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 931.
[24] N. C. GANGULI, *Chem. Abstr.*, 48 (1954) 3206.
[25] A. E. R. WESTMAN, A. E. SCOTT UND I. T. PEDLEY, *Chem. in Can.*, 4 (1952) 35.
[26] L. VELLUZ UND M. PESEZ, *Bull. soc. chim. France*, 17 (1950) 868.
[27] H. E. WADE UND D. M. MORGAN, *Nature*, 171 (1953) 529.
[28] V. C. RUNECKLES UND G. KROTKOV, *Arch. Biochem. Biophys.*, 70 (1957) 442.
[29] M. SHINAGAWA, J. TAKANAKA, Y. KISO, A. TSUKIJI UND Y. MATANA, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 28 (1955) 568.
[30] T. R. SATO, W. E. KISIELSKI, W. P. NORRIS UND H. H. STRAIN, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 438.
[31] M. D. KAMEN, *Radioactive Tracers in Biology*, Academic Press, Inc., New York, 1951, S. 429.
[32] A. A. BENSON, I. A. BASSHAM, M. CALVIN, T. C. GOODALE, V. A. HAAS UND W. STEPKA, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 1710.
[33] H. F. LINKSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1955.
[34] J. P. EBEL UND Y. VOLMAR, *Compt. rend.*, 233 (1951) 415.
[35] J. P. EBEL, *Compt. rend.*, 234 (1952) 621.
[36] J. P. EBEL, *Bull. soc. chim. France*, 20 (1953) 991, 998.
[37] J. P. EBEL, Y. VOLMAR UND B. JACOUB, *Compt. rend.*, 235 (1952) 372.
[38] E. STEGER UND A. SIMON, *Z. anorg. u. allgem. Chem.*, 291 (1957) 76.
[39] D. C. MORTIMER, *Can. J. Chem.*, 30 (1952) 653.
[40] K. GASSNER, *Mikrochim. Acta*, (1957) 594.
[41] H. REMY UND H. FALIUS, *Naturwiss.*, 44 (1957) 419.
[42] A. E. R. WESTMAN UND A. E. SCOTT, *Nature*, 168 (1951) 740.
[43] A. E. R. WESTMAN UND J. CROWTHER, *J. Am. Ceram. Soc.*, 37 (1954) 420.
[44] W. H. FRANK, *Angew. Chem.*, 68 (1956) 586.
[45] J. R. VAN WAZER UND E. KARL-KROUPA, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 1772.
[46] T. ANDO, J. ITO, S. H. ISHII UND T. SODA, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 25 (1952) 78.
[47] E. THILO, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, 12 (1957) 221.
[48] E. THILO UND J. GRUNZE, *Z. anorg. u. allgem. Chem.*, 290 (1957) 209.
[49] J. C. BAILAR, *The Chemistry of the Coordination Compounds*, Reinhold Publ. Corp., New York, Chapman & Hall, Ltd., London, 1956, S. 773;
Vgl. S. M. LAMBERT UND J. I. WATTERS, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 4262;
J. I. WATTERS, S. M. LAMBERT UND E. D. LOUGHRAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 3651.
[50] G. SCHWARZENBACH UND G. ANDEREGG, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 1229.
[51] J. R. VAN WAZER UND D. CAMPANELLA, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 655.
[52] M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 11 (1954) 524.

[53] E. THILO, H. G. GRUNZE, J. HÄMMERLING UND G. WERZ, *Z. Naturforsch.*, 11b (1956) 266.
E. THILO UND J. GRUNZE, *Z. anorg. u. allgem. Chem.*, 290 (1957) 223.
[54] W. F. PICKERING, *Anal. Chim. Acta*, 15 (1956) 337.
[55] E. BLASIUS UND A. CZEKAY, *Z. anal. Chem.*, 156 (1957) 7.
[56] K. W. GERRITSMA UND J. C. FREDERIKS, *Chem. Weekblad*, 51 (1955) 197.
[57] P. LEDERLE, *Z. anal. Chem.*, 121 (1941) 403.
[58] L. J. KING, *Biochem. J.*, 26 (1932) 292.
[59] J. B. MARTIN UND D. M. DOTY, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 401.
[60] E. RUF, *Z. anal. Chem.*, 151 (1956) 169.
[61] W. FRESENIUS UND G. JANDER, *Handbuch der analytischen Chemie*, Teil III, Vaβ Band, Phosphor, Springer Verl., Berlin, 1953.
[62] U. BOHNSTEDT UND R. BUDENZ, *Z. anal. Chem.*, 159 (1957) 12;
N. S. GING, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1330;
F. L. HAHN UND R. LUCKHAUS, *Z. anal. Chem.*, 149 (1956) 172;
C. H. LUECK UND P. F. BOLTZ, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1168.
[63] J. MEISSNER, *Z. anorg. u. allgem. Chem.*, 281 (1955) 293.
[64] Vgl. K. SCHREIER UND H. G. NÖLLER, *Arch. exptl. Pathol. u. Pharmakol., Naunyn-Schmiedeberg's*, 227 (1956) 199;
I. SCHMUTTE, K. LANG, L. SCHACHINGER, O. KARGES, J. E. BLUMENBERG UND G. ROSSMÜLLER, *Biochem. Z.*, 327 (1956) 118.
[65] G. D'AMORE, *Ann. Chim. (Rome)*, 46 (1956) 517.
[66] A. BONNIN UND P. SUE, *Compt. rend.*, 239 (1952) 960.

Eingegangen den 13. März 1958

REVIEW

METHODS FOR THE SEPARATION OF SOUTH AMERICAN STRYCHNOS AND INDIAN CURARE ALKALOIDS

G. B. MARINI-BETTÒLO AND G. C. CASINOVI
Istituto Superiore di Sanità, Rome (Italy)

In the chemical study of the active constituents of curares the research workers[13, 19, 21, 24, 26, 39, 51, 56, 58, 86, 87] are faced with a number of problems, which in spite of century-long investigation are not yet close to a definite solution.

These substances are alkaloids and are found in curares employed by numerous Amazonian tribes as arrow poisons, as well as in the bark of various species of *Strychnos*.

The first great difficulty lies in the fact that for many years the conventional methods did not allow an adequate separation, for analytical or preparatory purposes, of the many alkaloids to be found in the bark and roots of South American *Strychnos* species and in the curares derived therefrom.

The claim is well justified that also in this field the introduction of chromatographic methods has marked a turning point in the research.

In fact, it is due to HEINRICH WIELAND, who employed chromatography on an alumina column, that in 1941 the first pure alkaloids were obtained from calabash curares as well as from *S. toxifera*[91].

In 1952, SCHMID, KARRER and coworkers[85] introduced partition chromatography on a cellulose column for preparatory purposes. For analytical purposes they developed two-dimensional chromatography on paper using known alkaloids; by determining the rates of movement and colour reactions they supplied the basis for the identification of these substances. These methods have been adopted, with slight variations, by THEODOR WIELAND[94] and by MARINI-BETTÒLO and coworkers[1].

The difficulties inherent in the resolution of alkaloid mixtures by chromatographic methods only, whether on a column or on paper using one and two-dimensional systems, have subsequently led us to introduce the use of aqueous solvents in these methods[27], as well as electrophoretic techniques[59, 60], electrophoresis on cellulose columns and counter-current distribution[26].

The object of this review is to set forth and comment on the techniques and practical aspects of the various methods that make possible the solution of problems for which chromatographic methods alone appear to be insufficient.

An outline will, therefore, be given of:

1. Data concerning the starting material.
2. Preliminary assays for orientation purposes.
3. Methods for extracting all the alkaloids from curares and *Strychnos* species.
4. Analytical separation of alkaloids by:

References p. 432/433.

(a) paper strip chromatography;
(b) circular paper chromatography;
(c) paper electrophoresis;
(d) two-dimensional chromatography.

5. Preparative separation of alkaloids by:
(a) absorption chromatography on alumina columns;
(b) partition chromatography on cellulose columns;
(c) separation on paper sheets;
(d) band electrophoresis;
(e) continuous electrophoresis;
(f) column electrophoresis;
(g) counter-current distribution.

I. STARTING MATERIAL

The following two types of material are usually employed for the extraction of alkaloids:

1. Curares prepared by Amazonian Indians.
2. Plants of the genus *Strychnos* from South America.

In both cases there may be considerable differences between the various laboratory materials available.

The curares which contain quaternary curarizing alkaloids of the indole group, are differentiated into: calabash curares and "pot curares"*. As commonly known, they are prepared by Amazonian and Orinoco Indians by boiling extracts from various plants, including *Strychnos* bark; a sticky black mass is thus obtained containing concentrated alkaloids together with other substances.

From data reported in the literature it may be assumed that calabash curares contain about 8–10% of quaternary curarizing alkaloids.

Work on curares, which undoubtedly are a valuable material owing to their high concentration of active principles, is somewhat hampered by the presence of other alkaloids from other plants added during the preparation.

A more interesting material may be obtained from the bark and roots of *Strychnos* species. This has not undergone other transformations and is substantially made up of most of the alkaloids to be found in Indian curares. The alkaloid percentage, however, is very low; on an average it lies between 0.1 and 0.2%, and exceptionally 1%.

On the other hand two main difficulties are likely to be met with when using botanical material: first the exact botanical determination of the plant; second the finding of a sufficient quantity of material of the same species, since one rarely finds plants of the same species in one and the same region. This accounts for the fact that more than 1–2 kg of bark of a single species is not often available.

* One cannot at the present moment consider calabash curares as the only source of indole curarizing alkaloids. These alkaloids may be found in curares stored in various containers and even in glass bottles (see Symposium on Curares and Curarizing Substances, Rio de Janeiro, August 1957).

References p. 432/433.

Furthermore, it must be borne in mind that for alkaloid extraction the part of the *Strychnos* bark close to the ground and the roots are useful, whereas neither the branches nor the fruit can be utilized, since according to our observations they do not contain alkaloids even when these are plentiful in the bark and roots.

Another difficulty is the possible variation, as was found in some cases, in the alkaloid compositon in one and the same species according to its geographical distribution and the season when it was gathered.

2. PRELIMINARY ASSAYS

Since the available material is so heterogeneous, it may be necessary—particularly for the plant collector—to have a method of detecting the presence of curarizing alkaloids.

This can be carried out, in a preliminary way, by treating a few hundred milligrams of material on a spot plate with 4–5 drops of 5% acetic acid (or 10% tartaric acid) and then absorbing the coloured liquid with a bit of filter paper within a few minutes[23]. As soon as the paper has dried it should be treated with a 1% ceric sulphate solution[46]. If indole curarizing alkaloids are present the paper will turn red or violet or blue or green.

This test is so simple and rapid that it can be carried out in the field much to the advantage of the material collector. He is thus spared the trouble of gathering plants and carrying them hundreds of km before finding that they are of no use from the chemical point of view.

This method is applied today in Brazil when gathering botanical material.

3. METHODS OF EXTRACTING ALKALOIDS

The process for the extraction of alkaloids is more or less the same whether the curares are prepared by Indians or obtained from plant bark, since in both cases the curarizing alkaloids have to be separated from inert substances and from tertiary alkaloids.

WIELAND utilized extraction with methanol followed by boiling water. The alkaloids were then precipitated with mercuric chloride and converted to the reinecke salts which were subjected to chromatography on alumina columns[89–91].

SCHLITTLER AND HOHL[80] in their work on *S. melinoniana* percolated the powdered bark first with water and afterwards with methanol containing 3% acetic acid. KING, on the other hand, usually employed a 3% aqueous solution of tartaric acid[48], while SCHMID AND KARRER[85] used methanol and acetic acid.

One or two percent acetic acid is more convenient than tartaric acid, because the latter has to be removed as alkaline tartrates, which is not necessary in the case of the former.

The extracts obtained by the above methods are concentrated to small volumes, brought to pH 8 with ammonia or alkali and extracted with chloroform to separate

References p. 432/433.

tertiary bases. The solution is then treated with dilute hydrochloric acid and the alkaloids are precipitated either as reineckates or picrates.

The reinecke salts of the quaternary and some of the tertiary bases can be fractionated owing to their different solubilities in acetone–water[85], though this method is not always reliable.

The reinecke salts can also be purified directly on alumina columns (WIELAND and SCHLITTLER), but today it is considered better to transform them into chlorides by the Kapfhammer method, *i.e.*, by treating them with silver sulphate and then with barium chloride.

BOEKELHEIDE[20] extracts the calabash curares with water and then with methanol. The concentrated liquids are brought to pH 8 and then extracted with methylene chloride, thus eliminating the tertiary bases. The quaternary bases are afterwards precipitated with picric acid.

The mixture of alkaloid picrates is passed over an ion exchange resin (Dowex-II-X4 Cl) to recover the quaternary alkaloid chlorides.

4. ANALYTICAL SEPARATION OF ALKALOIDS

(*a*) *Paper strip chromatography*

It must be pointed out here that the peculiarities of quaternary ammonium derivatives make it rather difficult to decide which solvents are best suited for these separations.

TABLE I

COMPOSITION OF SOLVENTS USED IN CHROMATOGRAPHIC SEPARATIONS OF *Strychnos* AND CURARE ALKALOIDS*

Solvent composition	*Designation*	*Author*	*Reference*
Acetic ester–water–pyridine 200:200:90	A	KARRER	82
Methyl ethyl ketone–water–cellosolve 300:70:15	B	KARRER	82
Methyl ethyl ketone saturated with water and 1–3% methanol	C	KARRER	85
	2	MARINI-BETTÒLO	27
Acetic ester–pyridine–water 7.5:2.3:1.65	D	KARRER	85
	1	MARINI-BETTÒLO	27
Acetic ester–acetic acid–water 7.5:0.9:0.9	E	KARRER	85
n-Butanol–chloroform–water 10:10:0.6	F	KARRER	85
Ethyl acetate–methyl ethyl ketone–glycol monomethyl ether–water 200:300:154:200	A	TH. WIELAND	92
Acetic ester–pyridine–water 200:90:200	B	TH. WIELAND	92
Ethyl acetate–pyridine–water 1000:600:300	C	TH. WIELAND	92
Ethyl formate–acetone–water 1000:1450:400	D	TH. WIELAND	92
Methyl ethyl ketone–pyridine–water 1400:300:300	E	TH. WIELAND	92
Methyl ethyl ketone saturated with water containing 10% methanol	3	MARINI-BETTÒLO	27
5 g of $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ in 100 ml 10% acetic acid; the solution is saturated with amyl alcohol	4	MARINI-BETTÒLO	27
10 g $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ in 100 ml 10% acetic acid; the solution is treated as above	5	MARINI-BETTÒLO	27
n-Butanol saturated with water		BOEKELHEIDE	20

* It is important to avoid traces of peroxides in solvents. For this reason methyl ethyl ketone must be distilled before use and then passed over an ion-exchange column (Dowex-50-X4) with ferrous ion as the cation.

Butanol must also be purified by washing it with sodium bisulphite.

References p. 432/433.

TABLE II

R_C VALUES AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF ALKALOIDS FROM SOUTH AMERICAN *Strychnos* SPECIES AND CALABASH CURARES*

*Alkaloid***	R_C		*Colour*	*Fluorescence*	*Colour with $Ce(SO_4)_2$ (Spot plate)*	*Reference*
	C	*D*				
Erythrocurarine	0.12	0.31	Red	Red		64
Alkaloid A	0.23	0.55			Blue-violet	85
Solimoesine 3	0.27	—			Purple	63
Guiacurarine I	0.31	0.42	Brown-yellow		Blue-violet	64
Alkaloid B	0.34	0.51			Red-violet	85
Alkaloid C	0.34	0.51			Red-violet	85
Alkaloid D	0.35	0.68			Red-violet	85
Alkaloid E	0.36	0.58			Blue	85
Toxiferine I	0.42	0.67			Red-violet	85
Alkaloid F	0.49	0.73			Blue-violet	85
Guiacurarine 10	0.50	1.05			Violet	76
Alkaloid S chloromethylate	0.51	1.35			Purple-red	73
Macrophylline A	0.52	1.6			Violet	38
Rubrocurarine 4	0.52	0.50	Red	Red		64
Guiacurarine 8	0.58	0.56	Yellow	Yellow	Blue-violet	63
Rubrocurarine 3	0.63	0.54	Red	Red	Pale blue	64
Rubrocurarine 2	0.65	0.51	Red	Red		64
Alkaloid G	0.65	0.73			Blue	85
Fluorosolimoesine 2	0.67	1.2	Yellow	Yellow		63
Alkaloid R	0.68	0.92			Purple	73
Caracurine I	0.70				Purple-red	4
Alkaloid H	0.71	0.99			Red-violet	85
Erythrocurarine 3	0.72	1.00	Red	Red	Blue	76
Guiacurarine 9	0.73	0.94	Orange-red	Orange	Violet-blue	76
Guiacurarine 2	0.76	0.99			Violet-blue	64
Rubrocurarine 1	0.78	0.92	Red	Red		64
Fluorosolimoesine 3	0.79	3.1		Green-yellow		63
Fluorosolimoesine 4	0.79	2.0		Green-yellow		63
Caracurine II	0.8				Purple	4
Caracurine III	0.8	1.32			Purple-red	4
Calebassine (C-Toxiferine II = C-Strychnotoxine)	0.8	1.03			Blue-violet	85
Solimoesine 2	0.85	—			Red	63
Alkaloid I	0.89	1.06			Blue-violet	85
Solimocurarine	0.93	0.82			Blue-violet	63
Curarine	1.00	1.00			Blue	85
"Rotes Alkaloid"			Red			85
Caracurine IV	1.00				Violet	4
Guiacurine I	1.05	1.34			Blue-violet	64
Guiacurarine 2	1.07	1.33			Blue	64
Caracurine Va	1.1				Purple-blue	4
Alkaloid J	1.04	1.12			Red-violet	85

(Contd. on p. 416)

* At present there is some confusion in the nomenclature of alkaloids from *Strychnos* bark and calabash curares.

To avoid these difficulties a Commission to unify the nomenclature of these alkaloids was appointed at the International Symposium on Curare and Curarizing Substances in Rio de Janeiro, August 1957.

In this review we have used the names given in the original papers, with the exception that WIELAND's *C-Alkaloid* term has been simplified to *alkaloid*. The former term is now inaccurate because many C-alkaloids, *i.e.* calabash alkaloids, have been found in *Strychnos* species. Moreover the calabash alkaloids have also been found in other curares. The term C-alkaloid followed by letters was necessary in the past to avoid confusion with alkaloids from other plants. In this review no confusion is possible since only alkaloids of *Strychnos* and curare are referred to.

** The alkaloids are in the form of the chlorides unless otherwise stated.

References p. 432/433.

TABLE II (*Continued*)

Alkaloid	R_C		*Colour*	*Fluorescence*	*Colour with $Ce(SO_4)_2$ (Spot plate)*	*Reference*
	C	*D*				
Guaianine	1.12				Pale blue-violet	36
Caracurine IX chloromethylate	1.12				Violet	6
Alkaloid 2 fluorescent	1.18	1.05		Blue	Blue-violet	76
Alkaloid K (Dihydrotoxiferine)	1.22	1.14			Violet	85
Solimoesine I	1.3	1.54			Purple-violet	63
Caracurine V	1.4	—			Purple-red	4
Caracurine VII chloromethylate	1.40	—			Purple-orange	4
Erythrocurarine 2	1.43	1.15	Red	Red	No colour	64
Alkaloid M	1.45					3
Melinonine H	1.47					8
Melinonine K	1.52					8
Alkaloid Y	1.59	2.22			Red-violet	3
Caracurine VI	1.6				Purple	3
Macrophylline B	1.64	1.86			Violet	38
Calebassinine	1.68	1.38			No colour	85
Guiacurarine 3	1.70	1.64	Orange	Green-yellow	Green-blue	64
Diaboline	1.76	2.10			No colour	38
Fedamazine	1.9			Orange	Blue	7
Melinonine J	2.01					8
Melinonine F	2.01					8
Pseudofluorocurine	2.10		Yellow	Green-yellow	Orange-red	73
Caracurine VII	2.1				Orange	3
Fluorocurine	2.10	1.70	Yellow	Green-yellow	Orange	84
Fluorocordatine	2.13	1.20		Blue	Blue	76
Melinonine E	2.18					8
Fluorocurinine	2.23	1.65	Yellow	Yellow-green	Pale red	85
Fluorocurarine (C-Curarine III)	2.25	1.71	Pale yellow	Blue	Pale blue	85
Alkaloid UFC						85
Melinonine F	2.01					8
Melinonine M	2.42				Pale blue	8
Alkaloid L	2.50	1.99			Red	84
Desacetyldiaboline	2.64	2.42			Pink-red	76
Mavacurine	2.70	2.23			Red-violet	8,63
Precurarine	2.78	3.8			Blue	63
Fluorescent Alkaloid 1	2.90	1.69		Green-yellow	Pale red	76
Kryptocurine	2.95	3.10				72
Melinonine G	3.00					8
Fluorosolimoesine 1	3.00	1.5	Yellow	Yellow-green		63
Alkaloid X	3.5	4.9			Red	85
Alkaloid O	3.95	4.30			No colour	36
Premavacurine	4.0	3.6			Red-violet	63
Alkaloid P	—	—			Blue	36
Alkaloid 1						92
Alkaloid 2					Red-violet	92
Xanthocurine	—	1.58	Orange		Green-blue	36
Alkaloid UB		1.13			Brown	46
Alkaloid Q		4.92				73
Croceocurine			Orange-red			72
C-Strychnotoxine Ia	*					92
Nor-C-dihydrotoxiferine					Purple	6

* R_F 0.25 in TH. WIELAND'S solvent A.

References p. 432/433.

Various solvents have been tried out by different authors (see Table I), but except special cases the most suitable are KARRER AND SCHMID'S C and D, as they give fair resolutions and most of the displacement values recorded in the literature have been obtained with these solvents.

If a two-dimensional system is used, these solvents give in many cases a fairly satisfactory separation of many alkaloids.

In Table II the R_C values (displacements calculated with respect to curarine) of these substances are given in both solvents C and D, as well as other characteristics by which they can be recognized. In some cases when displacement rates refer to other alkaloids such as mavacurine or melinonine B, it is convenient to convert them into R_C values, by calculation, in order to attain a uniform expression.

In view of the low velocity of these alkaloids, chromatography must always be carried out continuously for 12 to 18 hours if good resolutions are to be attained.

The determination of R_C in the case of these alkaloids very often gives rise to considerable errors: it has been noticed, for instance, that although the same chromatographic conditions are maintained an increase in the quantity of the substances employed is sufficient to produce a strong variation in the R_C (Fig. 1).

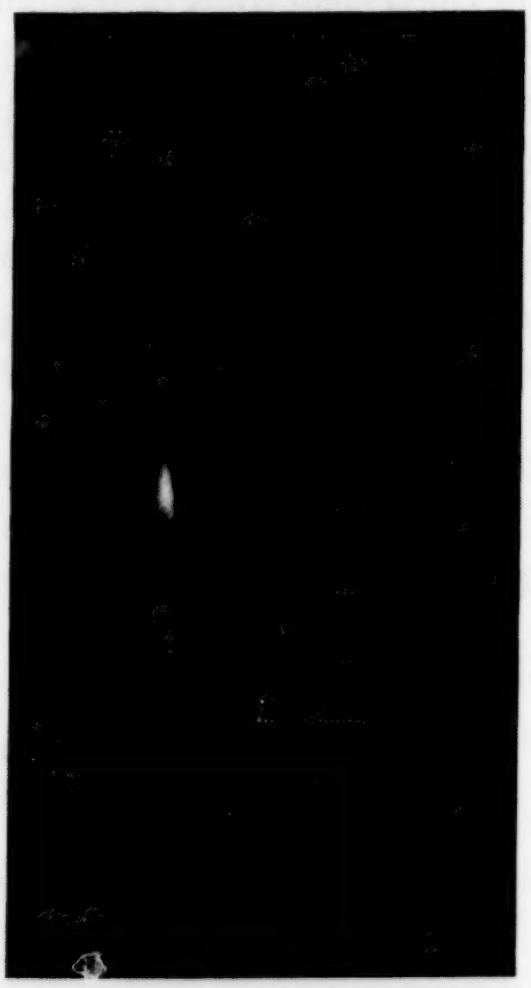


Fig. 1. Chromatograms of *S. parvifolia* alkaloids. Influence of the different weights of the sample on the R_F values.

SCHMID AND KARRER[85] had already pointed out that the R_C values are reproducible only when a 50 γ sample of alkaloid chloride is taken. Moreover, it is necessary that the standard curarine chloride should have a medium displacement of 11 cm for all alkaloids in solvent "C", and in solvent "D", 24 cm for alkaloids with $R_C < 1$, and 18 cm for those with $R_C > 1$.

References p. 432/433.

In the second place, it should be noted that when using different alkaloid mixtures an alteration and often an inversion occurs in the R_C values of the single alkaloids. Furthermore, the presence of large quantities of some alkaloids influences the movement of the others.

In fact, it is not uncommon that an alkaloid mixture which appears to be simple in two-dimensional chromatography turns out to be much more complex when a large quantity of the same mixture is used, the same experimental conditions being maintained.

(*b*) *Circular paper chromatography*

In the case of very complex alkaloid mixtures it has been found that one-dimensional separation on paper is rendered still more difficult by the partial overlapping of a long series of alkaloids, which have R_C values that are very close to each other. In such cases the components come out much more clearly if the chromatogram is run on a small band only a few centimetres wide[27].

Better results are obtained by means of Rutter's circular paper chromatography in that clear-cut bands appear which are well differentiated from neighbouring bands.

This system, though very convenient for a preliminary investigation of alkaloid mixtures, has, however, the drawback that comparison data are very scanty in the literature. Nevertheless, it is extremely useful for selecting the most suitable separation solvents and for making a rapid examination of certain mixtures.

(*c*) *Electrophoresis on paper*

By means of electrophoresis on paper it is possible to separate numerous curarizing alkaloids from *Strychnos* species, as was shown for the first time by MARINI-BETTÒLO AND LEDERER[59].

A good separation can be obtained by adjusting the conditions such as the pH of the buffer. Since electrophoresis is based on principles that are quite different to those of paper chromatography, substances that have identical R_C values may often be well separated.

For some alkaloids the mobility of the ions has been measured at various values of the pH; these mobilities are given in Table III.

TABLE III

ELECTROPHORETIC MIGRATION OF ALKALOIDS FROM *Strychnos* SPECIES AND CALABASH CURARES*

Alkaloids	*Displacement towards the cathode in 3 hours (in mm)*					
	pH 2.3	*pH 4.3*	*pH 6.4*	*pH 8.5*	*pH 10.5*	*pH 11.4*
Mavacurine	31	—	24	30	24	19
Fluorocurine	77	—	80	90	80	42
Alkaloid D	65	—	90	90	100	52
Calebassine	65	—	80	90	78	50
Curarine	106	98	110	108	—	64

* G. B. MARINI-BETTÒLO AND J. A. COCH FRUGONI, *Gazz. chim. ital.*, 86 (1956) 1326.

References p. 432/433.

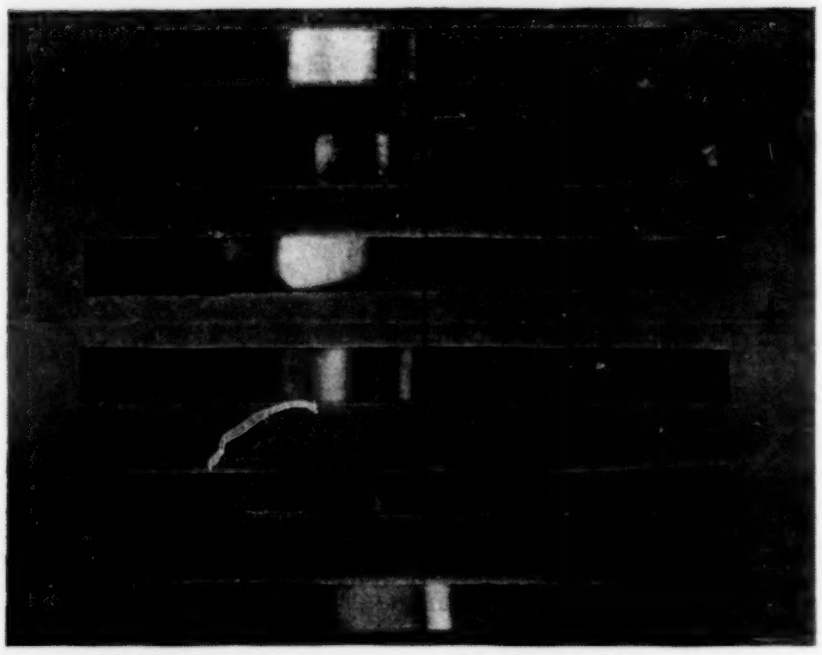


Fig. 2. Electrophoretic separation of *S. trinervis* alkaloids (fluorescent zones under U.V. light) (G. B. MARINI-BETTÒLO AND M. LEDERER, *Nature*, 174 (1954) 133).

Electrophoresis on paper strips chiefly permits the rapid identification of alkaloid groups rather than the single components that are present (Fig. 2).

To this end the portable apparatus designed by MARINI-BETTÒLO AND COCH FRUGONI may be usefully employed in the field[67].

(*d*) *Two-dimensional chromatography*

Two-dimensional chromatography is usually performed in the first direction with KARRER'S solvent "D" (Table I) and in the second direction with KARRER'S solvent "C" (Table I).

TH. WIELAND suggests other solvents as reported in Table I[94]. BOEKELHEIDE[20] found it more convenient to use a water–*n*-butanol mixture in one direction and KARRER'S solvent C in the other, thus avoiding the use of pyridine which is always troublesome.

For the determination of the relative displacement, curarine has generally been

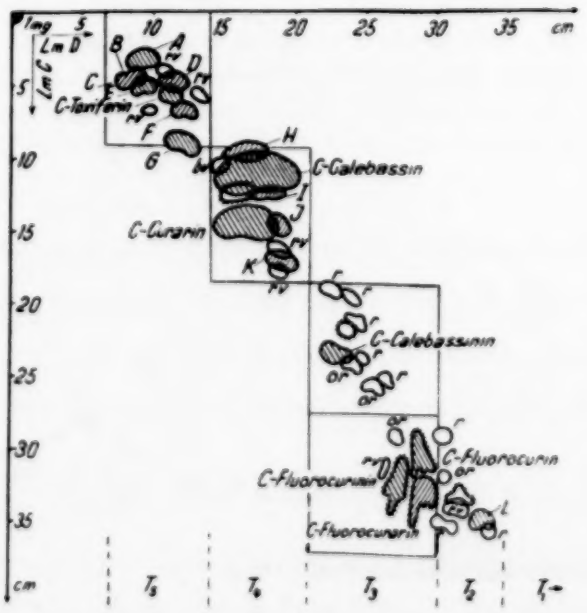


Fig. 3. Two-dimensional chromatogram of calabash curare alkaloid chlorides (H. SCHMID, J. KEBRLE AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 1864).

References p. 432/433.

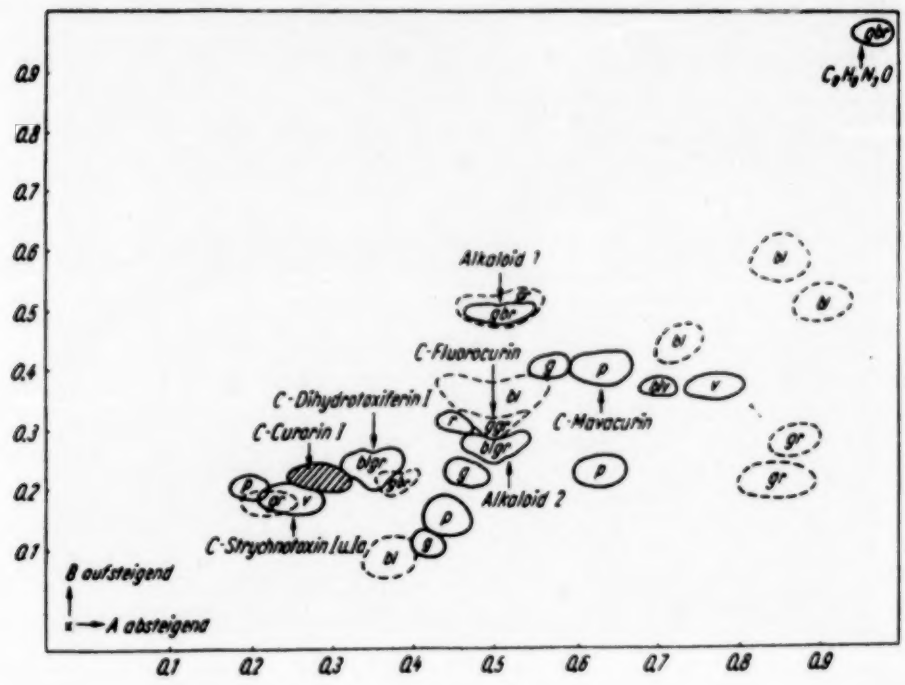


Fig. 4. Chromatogram of calabash curare alkaloid chlorides (TH. WIELAND AND H. MERZ, *Ber.* 85 (1952) 731).

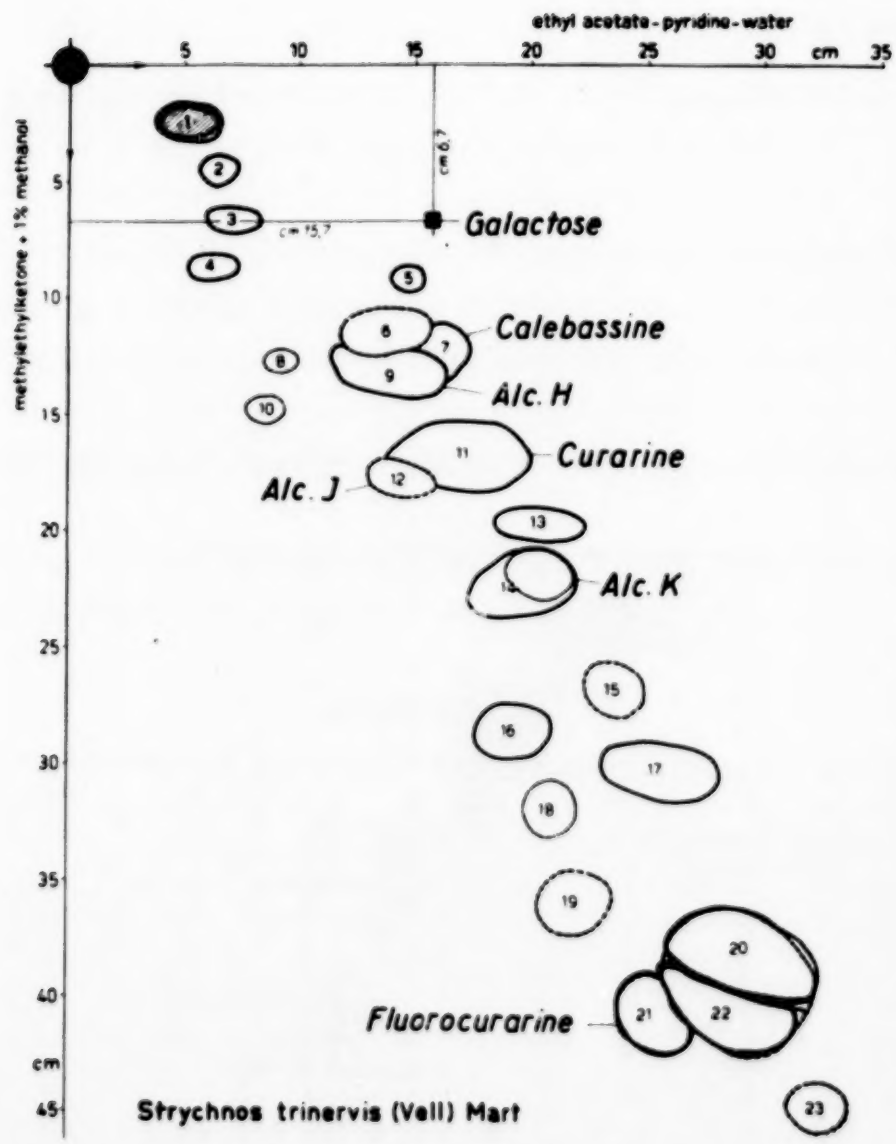


Fig. 5. Chromatogram of *S. trinervis* alkaloid chlorides (K. ADANK, D. BOVET, A. DUCKE AND G. B. MARINI-BETTÒLO, *Gazz. chim. ital.*, 83 (1953) 966).

References p. 432/433.

used as standard; other substances have, however also been taken, as previously stated, such as galactose and mavacurine[1,8].

Examination of the various chromatograms shows that the spots are ranged diagonally (Figs. 3, 4 and 5); this happens because the R_C values often have the same sequences in the two solvents. Here the same remarks apply which we made in the preceding pages with regard to reciprocal influences hampering the recognition of substances on the basis of R_C values only. This does not happen, for instance, with amino acids etc.

(e) Chromatography with aqueous solvents

To prevent a diagonal distribution of the alkaloids and thus facilitate the resolution of these mixtures, it is advisable to use other systems. To this end aqueous solvents

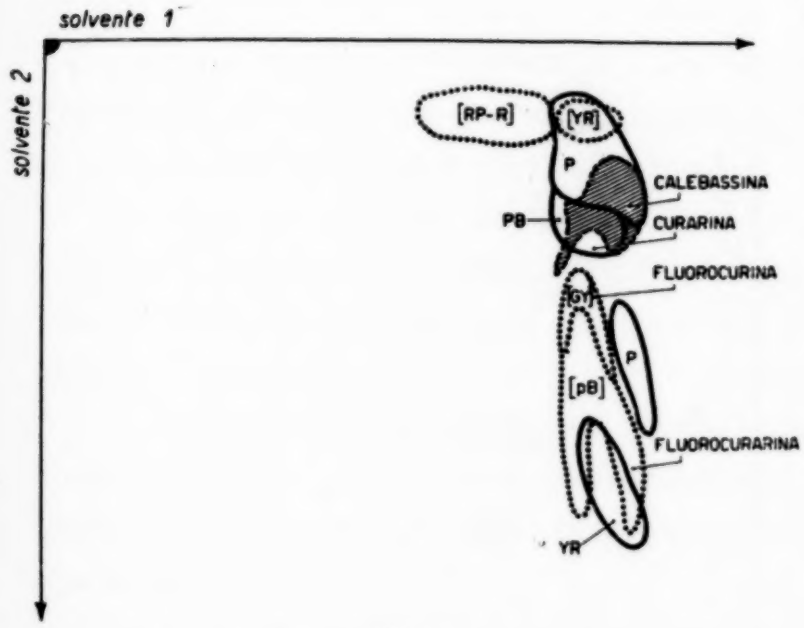


Fig. 6

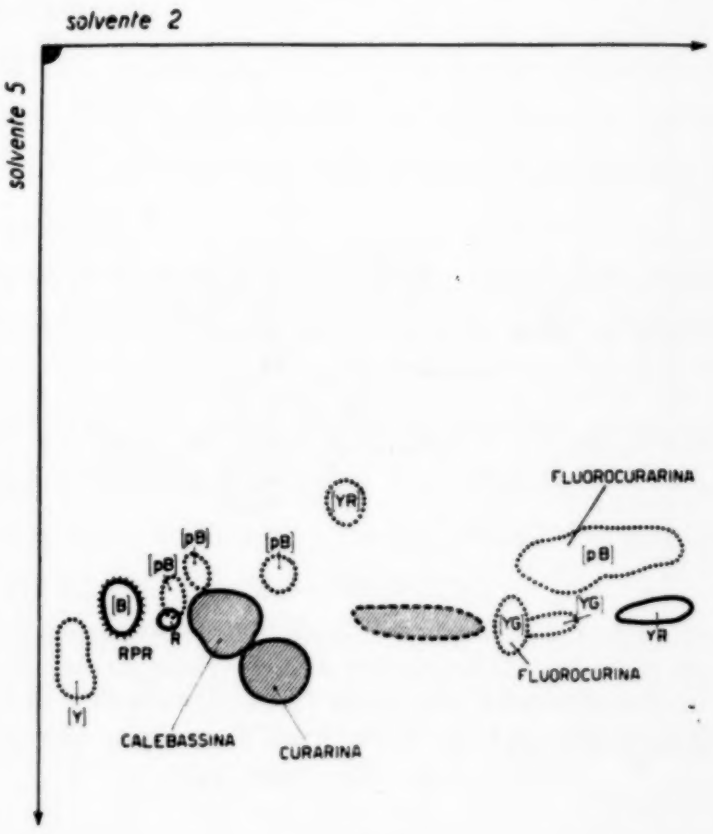


Fig. 7

Fig. 6. Two-dimensional chromatogram of *S. solimoesana* alkaloids (G. C. CASINOVI, M. LEDERER AND G. B. MARINI-BETTÒLO, *Gazz. chim. ital.*, 86 (1956) 342).
Fig. 7. Two-dimensional chromatogram of *S. solimoesana* alkaloids. First direction: organic solvent; second direction: aqueous solvent (G. C. CASINOVI, M. LEDERER AND G. B. MARINI-BETTÒLO, *Gazz. chim. ital.*, 86 (1956) 342).

have been suggested by CASINOVI, LEDERER AND MARINI-BETTÒLO[27].

Their study has been chiefly directed towards mixtures based on sodium acetate (see Table I), which, in the case of *S. solimoesana* Kruk, produced a clear inversion of the spot sequence (see Figs. 6 and 7) obtainable with KARRER'S solvents C and D[27].

(f) Combination of chromatographic and electrophoretic methods

By combining paper electrophoresis with chromatography, a very good resolution may be realized. This system has been suggested by CASINOVI, LEDERER AND MARINI-BETTÒLO[27] (see Fig. 8); electrophoresis should be used first and chromatography

afterwards, and in the former a volatile electrolyte buffer (acetic acid or/and amine) should be employed in order to avoid interferences with the chromatographic stage.

In this case also the various spots are no longer arranged diagonally as in the case, for instance, with *S. tomentosa* alkaloids (Fig. 9).

These methods, however, have the drawback that diffusion occurs which makes the definition of the spots less precise. The same applies to two-dimensional paper electrophoresis when several buffers or a single one with different ionic forces are used[59,60].

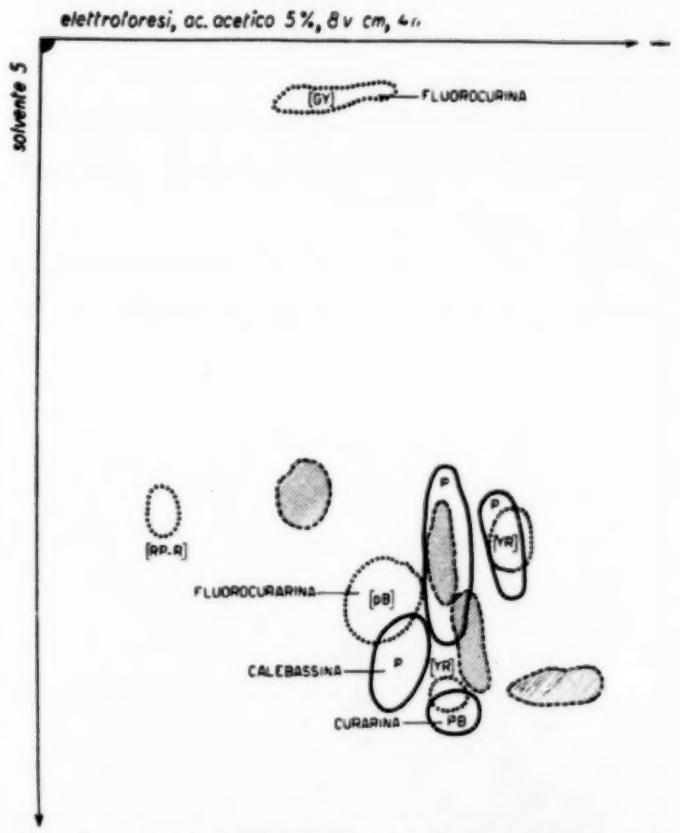


Fig. 8. Combination of electrophoresis and paper chromatography for the separation of *S. solimoesana* alkaloids (G. C. CASINOVI, M. LEDERER AND G. B. MARINI-BETTÒLO, *Gazz. chim. ital.*, 86 (1956) 342).

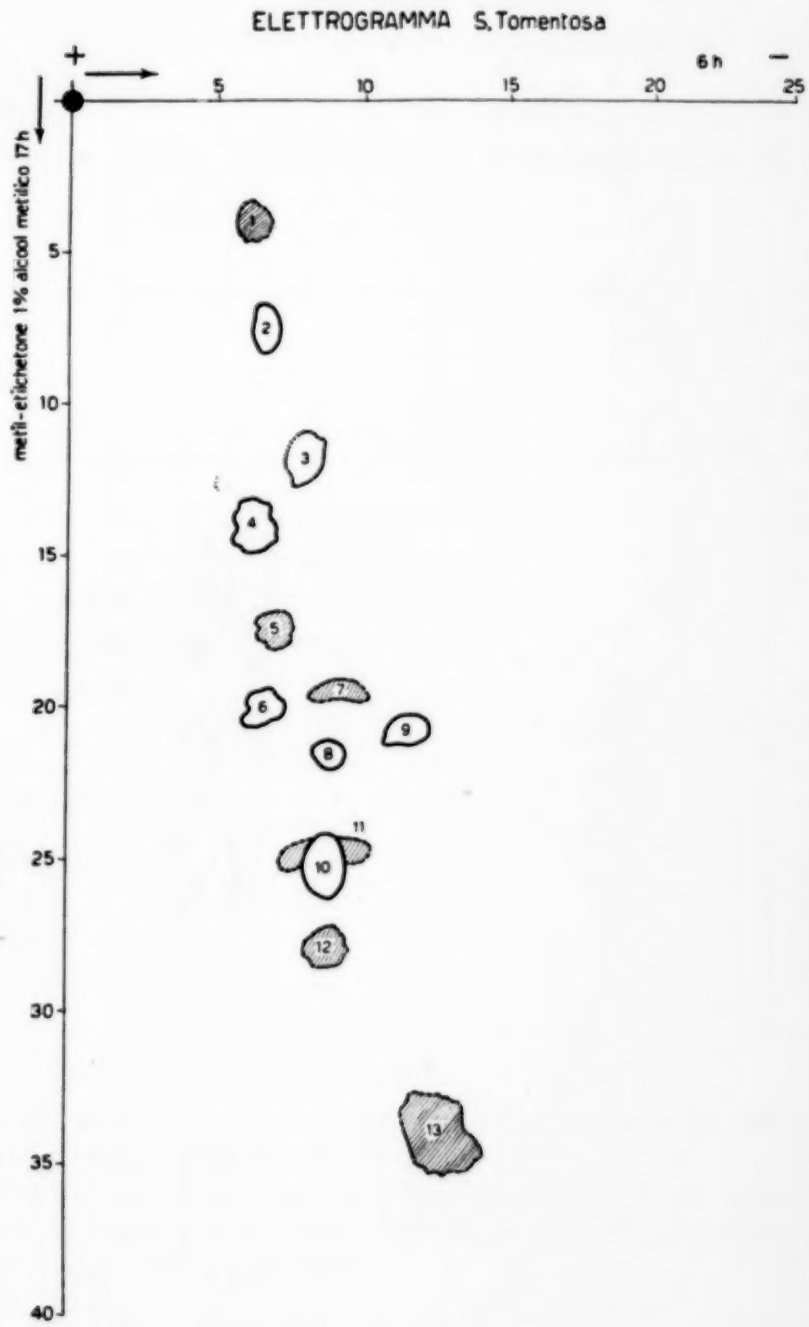


Fig. 9. Combination of electrophoresis and paper chromatography for the separation of *S. tomentosa* alkaloid chlorides (G. B. MARINI-BETTÒLO, M. LEDERER, M. A. IORIO AND A. PIMENTA *Gazz. chim. ital.*, 84 (1954) 1155).

5. PREPARATIVE SEPARATION METHODS

(a) *Chromatography on absorption columns*

Chromatography on alumina columns has provided the first method for obtaining pure alkaloids either from curares or South American *Strychnos* species.

H. WIELAND, who worked with columns of alumina or Fuller's earth and utilized

alkaloid reineckates or alkaloid perchlorates, was able to separate these alkaloids, whereby the first indication of the great complexity of these mixtures was obtained. SCHLITTLER AND HOHL[80] used alumina columns and eluted the reineckates of *S. diaboli* with acetone and methanol.

(*b*) *Partition chromatography on cellulose columns*

An improvement on the preceding method, which is, however, still being used for the separation of certain fractions, is the partition chromatography on cellulose columns, subsequently developed by SCHMID AND KARRER[85] and by TH. WIELAND[92]. In this separation KARRER's solvent "C" is mainly used as in paper strip or in two-dimensional chromatography. BOEKELHEIDE[20] suggests the use of a specially prepared cellulose column and butanol–water as solvent. After a first separation by elution, slow-moving fractions were extruded and extracted separately.

Yet, even under these conditions, it is only by working with very large quantities of substances and discarding many fractions that appreciable quantities of pure alkaloids can be obtained; when employing small quantities it is extremely difficult to realize preparative separations that are of any use.

Indeed, various factors affect the resolving power of partition columns; the most important of these are packing, height, homogeneity, elution velocity, and weight ratio between substance and absorbent.

As pointed out by MARTIN AND SYNGE[69], the maximum efficiency for a given column is obtained by using very fine charging material and very low elution speeds. This is the main drawback to the method, as the operations last so long that the zones already separated are apt to become mixed up again through diffusion.

A systematic study of the various factors and their influence should be made in order to understand fully their importance; such a study should be carried out with artificial mixtures, the resolution obtained with the various types of column being observed.

Our experiments in this field, however, have shown that the resolving power of a given column is not the same in the case of different groups of substances; thus although the performance of a column may prove satisfactory with some test substances, *e.g.* dyes, its behaviour may be quite different with alkaloids from *Strychnos* species and curares.

These results may possibly be attributed to the fact that other phenomena, besides mere partition, have an influence on the resolving power of a given column.

These considerations have already been brought forward by MARTIN AND SYNGE[69], by CRAIG[29] and by HECKER[37].

The necessity of examining the other characteristics of a column is a logical consequence of the above remarks. For testing purposes, samples of the substances to be separated should be used; but since pure samples of *Strychnos* alkaloids are difficult to obtain, particularly of the high degree of purity required for all the tests necessary for the systematic study, the problem cannot yet be investigated fully.

Yet, despite the lack of numerical and systematic data for direct comparison of

References p. 432/433.

the various columns employed, such a comparison can still be made by using paper chromatograms of mixtures of alkaloids that can easily be obtained and chromatograms of the same mixtures, or others containing the same alkaloids on various columns.

For instance, the usual procedure when investigating the content of alkaloids in a given plant is to determine the composition of the mixture by common methods. Once the composition is known, the problem of separation on a preparatory scale arises.

As a rule, the available material is both scarce and of a complex composition, due to the great number of alkaloids and the closeness of their R_C values; therefore, an efficient resolution is indispensable, also from a quantitative point of view.

A comparison between the resolving power of a strip of paper and column of

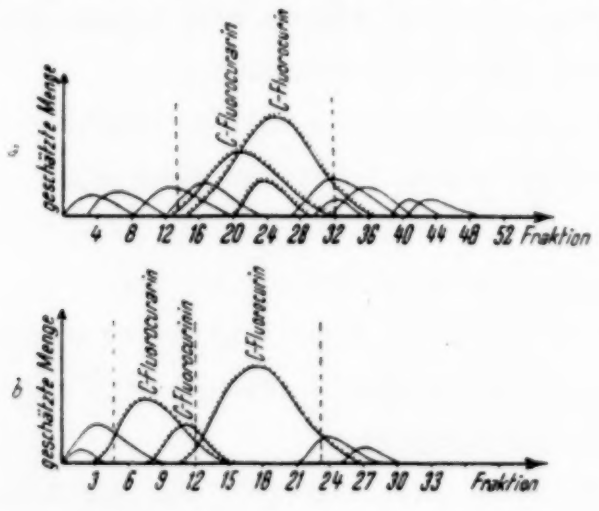


Fig. 10. Separation diagrams of calabash alkaloid chlorides (H. SCHMID, J. KEBRLE AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 1864).

equal length shows that the efficiency of the latter is very small, even when the charging density of the two is about the same and the weight ratio between mixture and cellulose is the same.

In their work on calabash curarizing alkaloids SCHMID AND KARRER[85] claim that the resolving power of the cellulose column coincides quantitatively with that of the corresponding paper chromatograms, but they only give schematic diagrams on the subject (Fig. 10).

A closer examination of these results shows, for instance, that in the T_5 group of the NIII fraction, alkaloids A (R_C: 0.55) and G (R_C: 0.73) are present together with other alkaloids, and that for their separation, contrary to expectation, many chromatograms using both solvents were necessary in order to secure complete resolution. Similar examples may be found in the work of the above-mentioned authors[85].

In the case of *S. melinoniana* alkaloids, BÄCHLI, VAMVACAS, SCHMID AND KARRER[8] give a diagram (Fig. 11) of the column chromatography of a mixture of at least 14 alkaloids, but the graph (see Fig. 11) shows only two well-separated maxima. Evi-

References p. 432/433.

dently, the resolving power is not high. As a further confirmation, reference may be made to the work of CASINOVI[26], who, when separating a relatively simple mixture of *S. amazonica* alkaloids, proved the inefficiency of a column whose resolving power was considerable for dye mixtures; consequently he had to resort to counter-current distribution in order to obtain satisfactory separations.

In an investigation of the fractionation of *S. macrophylla*[38] alkaloids by means of a cellulose column under normal conditions, it was found, by subjecting the fractions

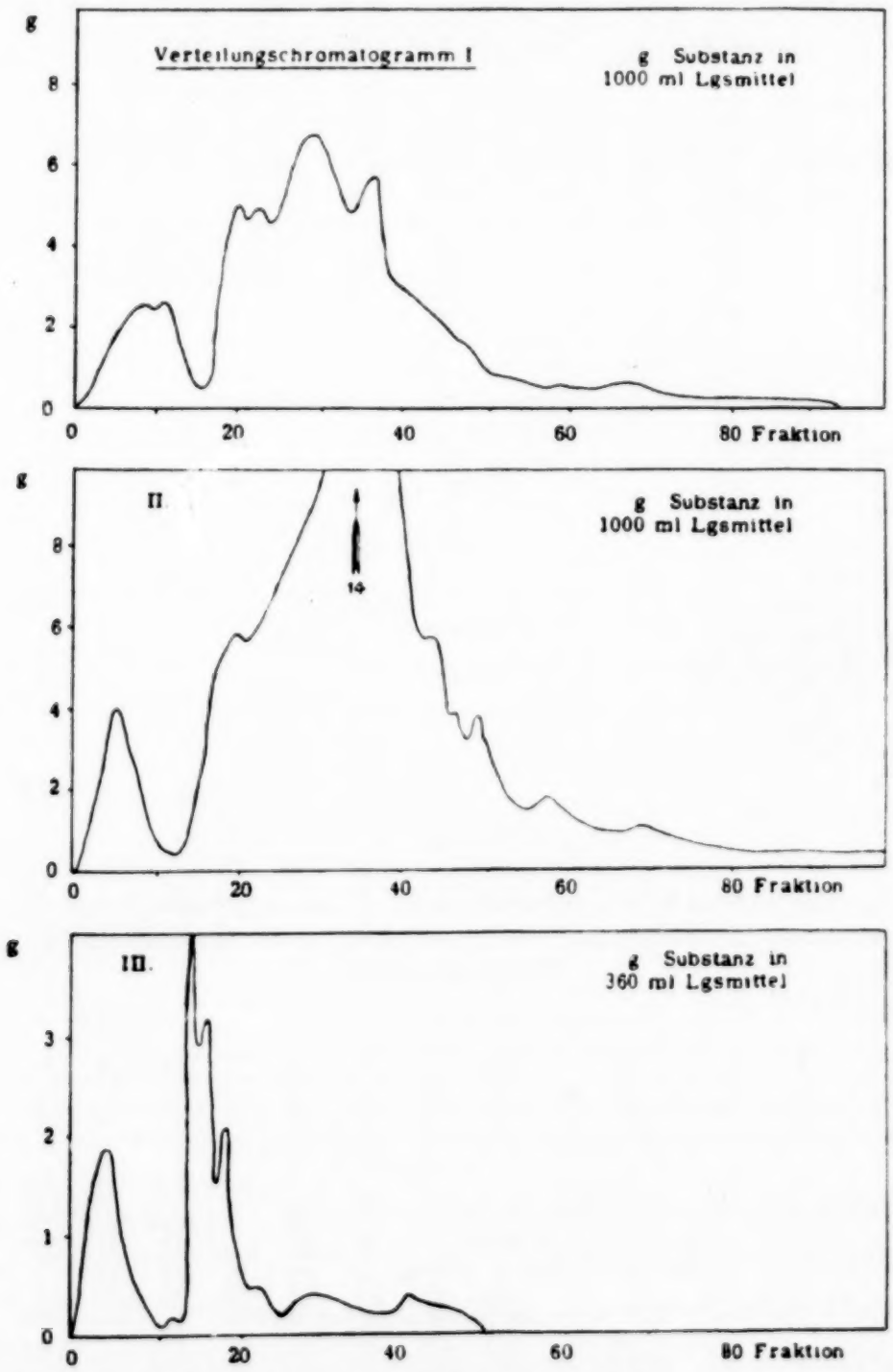


Fig. 11. Separation diagrams of *S. melinoniana* Baill. alkaloid chlorides (E. BÄCHLI, C. VAMVACAS, H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 1181).

to paper chromatography, that the fractionation is fairly satisfactory for those alkaloids (Mavacurine – Macrophylline B or Macrophylline A and B) whose R_C ratio is very high, but that it is practically *nil* for alkaloids whose R_C values are very close together, *e.g.*, Fluorocurarine–Mavacurine, which on a paper strip of equal length would be easily separated (Fig. 12).

When the mixture consists of a great number of alkaloids, whose R_C values are

very close together, as is the case with *S. solimoesana* Kruk., the cellulose column can only perform a preliminary separation into various groups and the isolation of small quantities of the single components is only possible by means of repeated chromatography on paper sheets[63].

The same considerations apply to alkaloids from *S. guianensis*[64] (Fig. 13) and *S. subcordata*[76], and to WIELAND'S calabash curares (Fig. 14).

From what has been said about columns it follows that it is necessary on the one hand to improve their resolving capacity—a problem which is now being studied—and on the other to resort to more efficient methods in which the undesirable effects

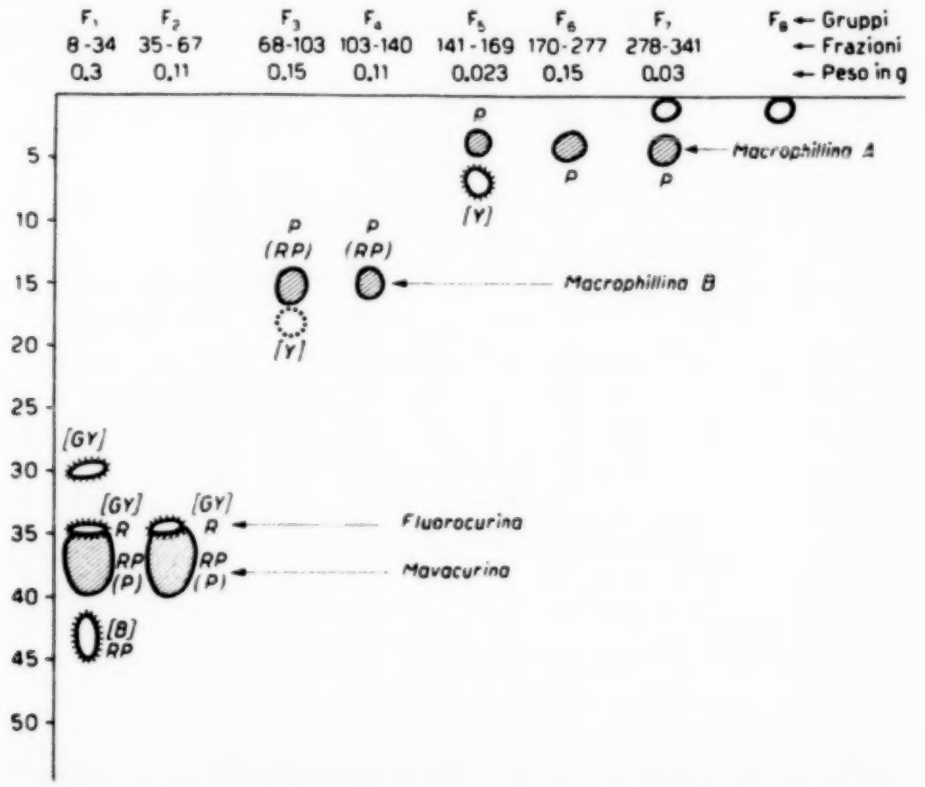


Fig. 12. Schematic representation of the separation of *S. macrophylla* Barb. R. alkaloid chlorides (M. A. IORIO, O. CORVILLON, H. MAGALHÃES ALVES AND G. B. MARINI-BETTÒLO, *Gazz. chim. ital.*, 86 (1956) 923).

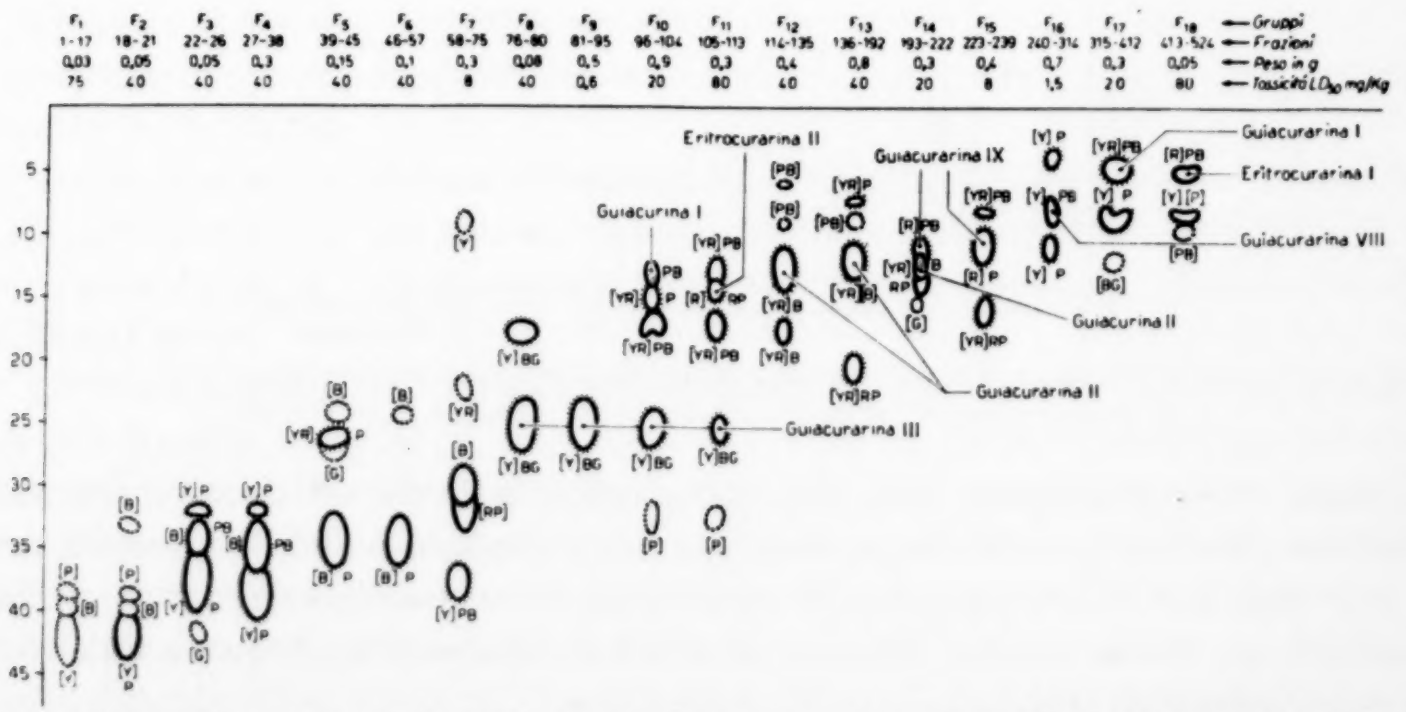


Fig. 13. Schematic representation of the separation of *S. guianensis* Aubl. Mart. alkaloid chlorides (G. B. MARINI-BETTÒLO AND M. A. IORIO, *Gazz. chim. ital.*, 86 (1956) 1305).

References p. 432/433.

of powdered cellulose are avoided, such as column electrophoresis and counter-current distribution, the first results of which seem to be rather promising.

(c) *Preparative separation on paper sheets*

Whenever the resolution of mixtures on cellulose or alumina columns is found to be difficult, one may resort to paper sheet chromatography since it allows the isolation of small quantities of pure alkaloids.

To this end, from 10 to 30 mg of total alkaloids, or fractions containing a number of alkaloids, are placed on sheets of Whatman paper No. 1 or 3 MM along a line and

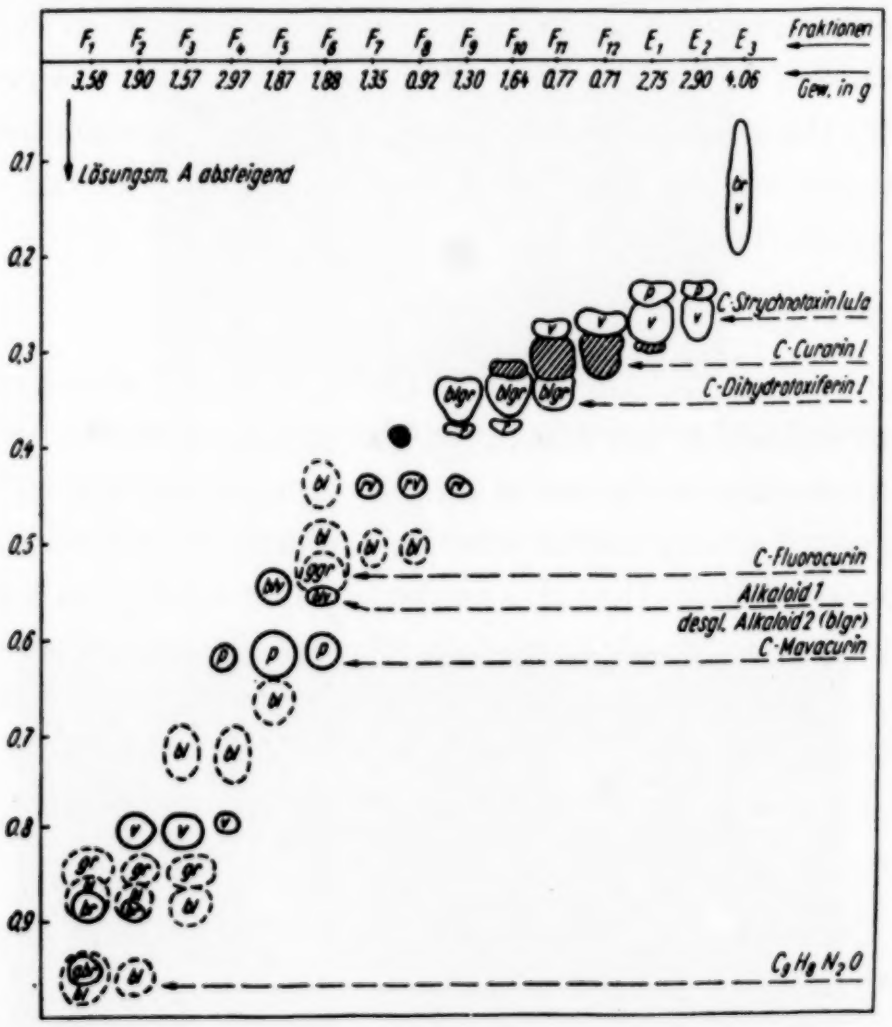


Fig. 14. Schematic representation of the separation of calabash alkaloid chlorides (TH. WIELAND AND H. MERZ, *Ber.*, 85 (1952) 731).

chromatography is effected in the usual way. Bands can be detected under a Wood's lamp or they can be revealed on the strip by applying colour reagents. The bands can then be cut out and eluted. The alkaloid can be recovered from the eluate and again subjected to chromatography, until a fraction is obtained that is chromatographically pure.

In the case of very complex mixtures with strongly differing R_C values, after cutting out the bands whose resolution appears satisfactory, another sheet of paper should be used and chromatography continued until a satisfactory resolution of the other bands is reached.

This method has been successfully employed with mixtures of alkaloids from *S. solimoesana*[63], *S. guianensis*[62] and *S. subcordata*[76]; numerous pure alkaloids can be obtained in this way (Fig. 16).

References p. 432/433.

(d) Band electrophoresis

Besides band chromatography, it may occasionally be advantageous to carry out a band electrophoresis in order to separate certain components. The fractionation of *S. guianensis* alkaloids may serve as an example of this point[64].

Since electrophoresis brings about a considerable diffusion of the bands, it is not advisable to repeat the operation, as is the practice in chromatography; instead electrophoresis should be followed by chromatography of the eluate on a paper sheet.

(e) Continuous electrophoresis

A method that has been tested by LEDERER AND MARINI-BETTÒLO* with *S. guianensis* and *S. Froesii* is that of continuous electrophoresis (see Fig. 17). A good fractionation can be obtained by this method if dilute acetic acid is used as electrolyte; the results are, however, not particularly good since the long duration of the operation causes alteration of the products.

(f) Column electrophoresis

The application of column electrophoresis to the analytical study of mixtures of South American *Strychnos* alkaloids has already given promising results; although by itself it does not yield a complete resolution of mixtures, in conjunction with paper chromatography it has proved a very useful subsidiary means of research.

From the above it follows that this method can be applied on a preparative scale, particularly for preliminary resolutions of mixtures of alkaloids obtained from partition chromatograms or counter-current distribution. The results of a considerable number of preliminary investigations on the application of column electrophoresis to the purification of *S. amazonica* alkaloids obtained from counter-current distribution, are

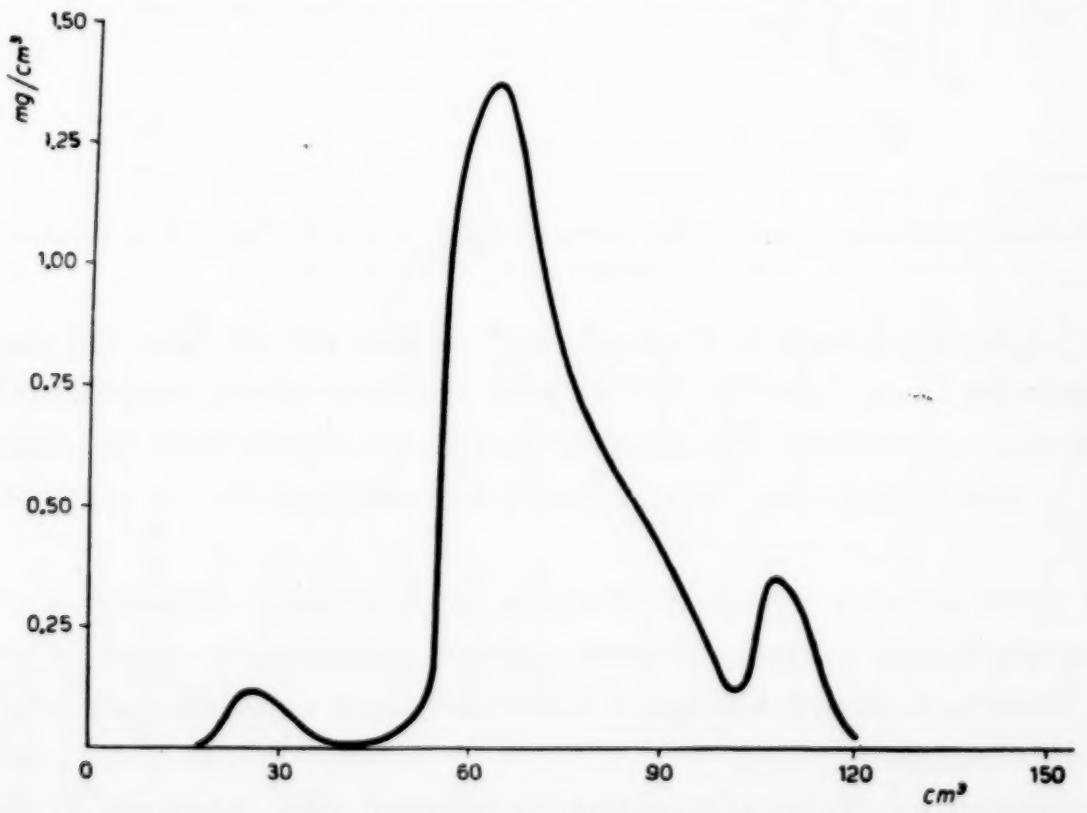


Fig. 15. Elution diagram of column electrophoresis of *S. amazonica* Kruk. alkaloids (G. C. CASINOVI, *Gazz. chim. ital.*, 87 (1957) 1457).

* Unpublished results.

References p. 432/433.

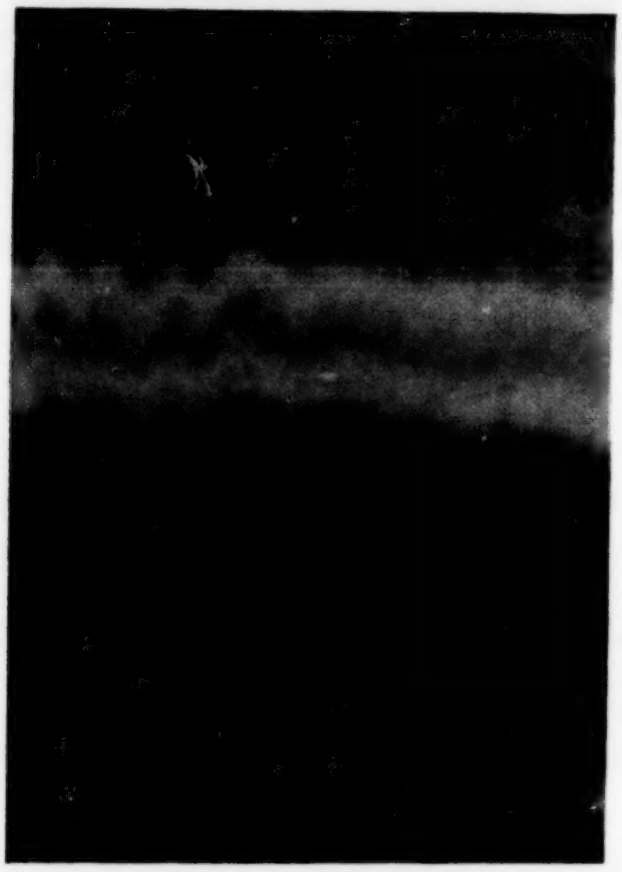


Fig. 16. Separation of *S. subcordata* alkaloid chlorides on a paper sheet.

Fig. 17. Continuous electrophoresis of *S. Froesii* Ducke alkaloid chlorides (M. LEDERER AND G. B. MARINI-BETTÒLO, unpublished results).

References p. 432/433.

given in Fig. 15. This figure shows the elution curves of an electropherogram of crude alkaloids, which was obtained on a column of 2 × 100 cm, a potential of 800 V being applied for 14 hours and 2% acetic acid being used as electrolyte[26].

If the experimental data are plotted in a co-ordinate system in which the number of c.c. of eluate are taken as abscissae and the concentrations as ordinates, it will be seen how the principal alkaloid is separated from small quantities of other alkaloids, which separation could not have been effected so quickly by partition chromatography or counter-current distribution.

The aim of current studies on this subject is to establish whether this method can be applied not only to purification, but also to the preliminary fractionation of groups of substances that are to be subsequently separated by other methods.

(g) *Counter-current distribution*

Counter-current distribution is a highly efficient quantitative mehod, which can also be used on a preparative scale. It has numerous advantages over partition chromatography, such as:

1. The possibility of checking the course of the separation at any time by chromatographing small samples.

2. The absence, thanks to the discontinuity of the process, of diffusion phenomena, which in chromatography might affect the efficiency of the method in case of interruption of the flow in the column or long duration of the process.

3. The absence of irreversible adsorption phenomena, which on columns bring

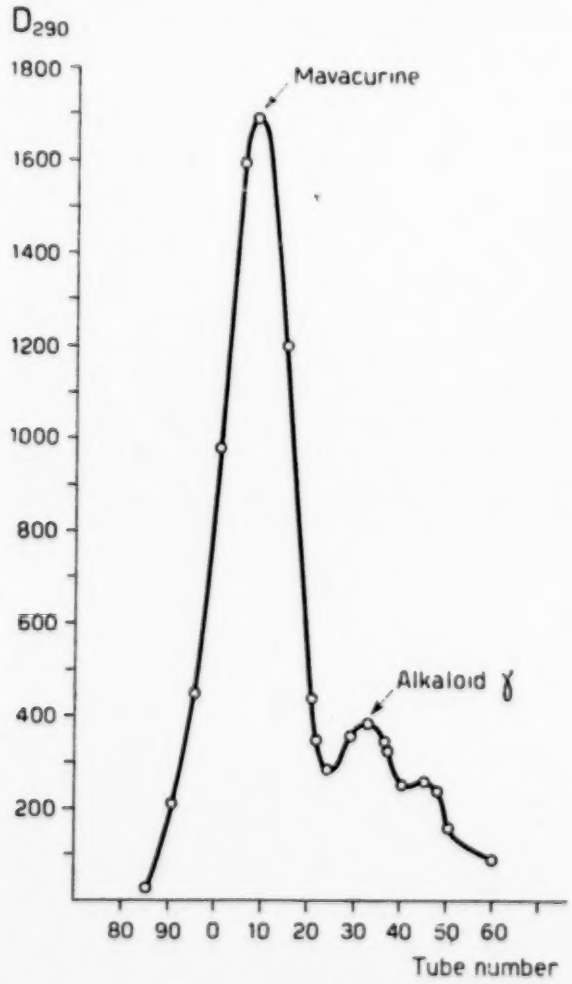


Fig. 18. Distribution diagram of *S. parvifolia* alkaloids in counter-current distribution (solvents: butanol–water).

References p. 432/433.

about a loss of substance and hamper successful performance, as well as the absence of all wall effects, which reduce the column's resolving efficiency.

The disadvantages lie in the complexity of the equipment, which is larger than in chromatography, the long duration of the process and the fact that emulsions are easily formed, which increases the time of operation.

CASINOVI[26] applied this technique to the separation of a fairly simple alkaloid mixture from *S. amazonica*. The apparatus had 15 tubes, the solvents were methyl ethyl ketone–water, and the operation was carried out with 1 g of total alkaloids. After 14, 18, 42 and 56 stages, the process was followed by chromatography. Using the same alkaloid mixture, and employing butanol–water and an apparatus with 25 tubes on the basis of data resulting from previous operations, it is possible to resolve almost entirely the mixture of *S. amazonica* alkaloids.

A third example of the application of this technique is the purification of an alkaloid that shows an intense yellow-green fluorescence under U.V. light. Owing to the low partition coefficient, the distribution was continued for 400 stages with the recycling method.

Once stage 400 had been reached, the distribution curve was plotted from measurements of the fluorescence under U.V. light: the resulting curve clearly proves that the product is homogeneous.

These tests, which up to the present have been carried out with a small apparatus have given interesting results. It may be assumed that by employing multi-tube apparatus the separation of two or more alkaloids whose partition coefficients are close together, will also be possible and that good results will be obtained, as is shown by diagrams obtained with 300 stages in an automatic device (Fig. 18)*.

CONCLUSION

An examination of the present development of methods for separating *Strychnos* quaternary alkaloids, shows that owing to the employment of chromatographic techniques considerable progress has been made in recent years in the separation and identification of these substances.

The peculiar physico-chemical nature of quaternary alkaloids and the complexity of natural mixtures, however, make it sometimes difficult, even nowadays, to obtain pure products and to identify them on the basis of R_C values, a difficulty not met with in the case of sugars, amino acids and nucleotides.

In fact, it should be remembered that, according to what SCHLITTLER AND HOHL[80] wrote some years ago:

"die Bearbeitung der Calebassen-Alkaloide ist ausserordentlich schwierig; sie krankt auch daran, dass beinahe jede einzelne Calebasse bei der Aufarbeitung ein gesondertes Probleme darstellt". The same can be said about the *Strychnos* bark and root alkaloids.

Today, other techniques besides chromatography are available, such as zone-

* Unpublished results.

References p. 432/433.

electrophoresis and counter-current distribution, which are based on different principles and offer new possibilities.

Moreover, it is worth noting that further progress is being made in the field of fractionation by combining various chromatographic techniques; examples are the separation of *S. toxifera* alkaloids where partition chromatography and chromatography on alumina are alternately employed[4], or the separation of alkaloids from *S. guianensis*[64] and *S. amazonica*[26] by combining chromatographic methods with electrophoresis and counter-current distribution.

These methods warrant our belief that it will be possible to resolve many mixtures that could not be fractionated up to the present. We are also of the opinion that here as elsewhere the necessity becomes ever greater of utilizing all available methods of separation.

REFERENCES

1 K. ADANK, D. BOVET, A. DUCKE AND G. B. MARINI-BETTÒLO, *Gazz. chim. ital.*, 83 (1953) 966.
2 W. ARNOLD, W. VON PHILIPSBORN, H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 705.
3 H. ASMIS, E. BÄCHLI, E. GIESBRECHT, J. KEBRLE, J. SCHMID, H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 37 (1954) 1968.
4 H. ASMIS, H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 37 (1954) 1983.
5 H. ASMIS, E. BÄCHLI, H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 37 (1954) 1993.
6 H. ASMIS, P. WASER, H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 38 (1955) 1661.
7 H. ASMIS, H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 440.
8 E. BÄCHLI, C. VAMVACAS, H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 1167.
9 F. E. BADER, E. SCHLITTLER AND H. SCHWARZ, *Helv. Chim. Acta*, 36 (1953) 1256.
10 J. BARBOSA RODRIGUES, *L'uiaery ou curare*, Brussels, 1903.
11 K. BERNAUER, H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 731.
12 K. BERNAUER, E. BÄCHLI, H. SCHMID AND P. KARRER, *Angew. Chem.*, 69 (1957) 59.
13 P. DE BERREDO CARNEIRO, *Compt. rend.*, 206 (1938) 1202; 208 (1939) 382, 1429.
14 P. DE BERREDO CARNEIRO, *Bull. soc. chim. biol.*, 21 (1939) 282, 1389.
15 P. DE BERREDO CARNEIRO, *Academica das Ciencias de Lisboa, Biblioteca de Altos Estudos*, (1944).
16 H. BICKEL, E. GIESBRECHT, J. KEBRLE, H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 37 (1954) 553.
17 H. BICKEL, H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 38 (1955) 649.
18 E. BIOCCA, Pesquisas sobre o metodo de preparaçao do curare pelos indios, *Rev. mus. paulista (São Paulo)*, (N.S.) 8 (1954) 165.
19 R. BOEHM, *Abhandl. kgl. sächs. Ges. Wiss.*, 22 (1895) 201; 24 (1897) 1.
20 V. BOEKELHEIDE, *J. Am. Chem. Soc.*, in the press.
21 J. B. BOUSSINGAULT AND ROULIN, *Ann. chim. et phys.*, [2] 39 (1828) 29.
22 D. BOVET AND F. BOVET NITTI, *Médicaments du système nerveux végétatif*, Karger, Basel, 1948, p. 626.
23 D. BOVET, A. DUCKE, K. ADANK AND G. B. MARINI-BETTÒLO, *Gazz. chim. ital.*, 84 (1954) 1141.
24 D. BOVET AND F. BOVET NITTI, *Rend. ist. super. sanità*, 12 (1949) 3.
25 D. BOVET AND F. BOVET NITTI, *Experientia*, 4 (1948) 325.
26 G. C. CASINOVI, *Gazz. chim. ital.*, 87 (1957) 1457.
27 G. C. CASINOVI, M. LEDERER AND G. B. MARINI-BETTÒLO, *Gazz. chim. ital.*, 86 (1956) 342.
28 F. DE CASTELNAU, *Expédition de l'Amérique du Sud*, tome 3, Paris, 1851, p. 17.
29 L. C. CRAIG, *Anal. Chem.*, 22 (1950) 1346.
30 A. DUCKE, *Arquiv. jardim. botân. Rio de Janeiro*, 6 (1933) 79.
31 A. DUCKE, O genero Strychnos, *Bol. téc. inst. agron. norte (Belém, Brazil)*, 3 (1945).
32 A. DUCKE, Plantas novas ou pouco conhecidas da Amazonas, *Bol. téc. inst. agron. norte (Belém, Brazil)*, 19 (1950) 20.
33 A. DUCKE, O genero Strychnos no Brasil, *Bol. téc. inst. agron. norte (Belém, Brazil)*, 30 (1955).
34 K. FOLKERS, *J. Am. Pharm. Assoc.*, 27 (1938) 689.
35 K. FOLKERS AND K. UNNA, *Arch. intern. pharmacodynamie*, 59 (1939) 370.
36 E. GIESBRECHT, H. MEYER, E. BÄCHLI, H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 37 (1954) 1974.
37 E. HECKER, *Z. Naturforsch.*, 8b (1953) 86.

[38] M. A. IORIO, O. CORVILLON, H. MAGALHÃES, M. H. ALVES AND G. B. MARINI-BETTÒLO, *Gazz. chim. ital.*, 86 (1956) 923.
[39] C. JOBERT, *Compt. rend.*, 86 (1878) 121; 89 (1879) 646.
[40] P. KARRER, *Nature*, 176 (1955) 277.
[41] P. KARRER AND H. SCHMID, *Angew. Chem.*, 67 (1955) 361.
[42] P. KARRER AND H. SCHMID, *Helv. Chim. Acta*, 29 (1946) 1853.
[43] P. KARRER AND H. SCHMID, *Helv. Chim. Acta*, 30 (1947) 2081.
[44] P. KARRER AND H. SCHMID, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 512.
[45] J. KEBRLE, H. SCHMID, P. WASER AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 36 (1953) 345.
[46] J. KEBRLE, H. SCHMID, P. WASER AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 36 (1953) 102.
[47] J. KEBRLE, H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 36 (1953) 1384.
[48] H. KING, *J. Chem. Soc.*, (1949) 955 and 3263.
[49] B. A. KRUKOFF AND H. N. MOLDENKE, *Brittonia*, 3 (1938) 1–74.
[50] B. A. KRUKOFF AND J. MONACHINO, The American Species of Strychnos, *Brittonia*, 4 (1942) 248–322.
[51] B. A. KRUKOFF AND J. MONACHINO, *Bol. téc. inst. agron. norte (Belém, Brazil)*, 11 (1947).
[52] B. A. KRUKOFF AND J. MONACHINO, *Bol. téc. inst. agron. norte (Belém, Brazil)*, 12 (1947).
[53] B. A. KRUKOFF AND J. MONACHINO, *Bol. téc. inst. agron. norte (Belém, Brazil)*, 20 (1950).
[54] B. A. KRUKOFF AND A. C. SMITH, *Bull. Torrey Botan. Club*, 66 (1939) 305.
[55] J. B. DE LACERDA, *Compt. rend.*, 89 (1879) 582, 1034.
[56] LA CONDAMINE, *Hist. Acad. Soc.*, 1745 (Paris), 1749, Mem. 489.
[57] O. DE LAZZARINI PECKOLT, *Rev. soc. brasil. quím.*, 19 (1950) 3.
[58] A. R. MCINTYRE, *Curare, Its History, Nature and Clinical Use*, The University of Chicago Press, Chicago, 1947.
[59] G. B. MARINI-BETTÒLO AND M. LEDERER, *Nature*, 174 (1954) 133.
[60] G. B. MARINI-BETTÒLO, M. LEDERER, M. A. IORIO AND A. PIMENTA, *Gazz. chim. ital.*, 84 (1954) 1155.
[61] G. B. MARINI-BETTÒLO, M. A. IORIO, A. PIMENTA, A. DUCKE AND D. BOVET, *Gazz. chim. ital.*, 84 (1954) 1161.
[62] G. B. MARINI-BETTÒLO AND M. A. IORIO, *Résumés trav. XIVe congr. intern. chim. pure et appl., Zurich, 1955*, p. 152.
[63] G. B. MARINI-BETTÒLO, P. DE BERREDO CARNEIRO AND G. C. CASINOVI, *Gazz. chim. ital.*, 86 (1956) 1148.
[64] G. B. MARINI-BETTÒLO AND M. A. IORIO, *Gazz. chim. ital.*, 86 (1956) 1305.
[65] G. B. MARINI-BETTÒLO AND D. BOVET, *Selected Sci. Papers Ist. Super. Sanità*, 1 (1956) 26.
[66] G. B. MARINI-BETTÒLO, *Festschr. Arthur Stoll*, Birkhäuser, Basel, 1957, p. 2.
[67] G. B. MARINI-BETTÒLO AND J. A. COCH FRUGONI, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 182.
[68] D. F. MARSH, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 54 (1951) 307.
[69] A. J. P. MARTIN AND R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 35 (1941) 1363.
[70] C. F. VON MARTIUS, *Flora Brasiliensis*, Wien, 1868.
[71] C. F. VON MARTIUS AND J. B. SPED, *Reise in Brasilien*, München, 1831.
[72] H. MEYER, H. SCHMID, P. WASER AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 1214.
[73] H. MEYER, H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 1208.
[74] L. PAOLONI AND G. B. MARINI-BETTÒLO, *Nature*, 179 (1957) 41.
[75] J. PELLETIER AND H. PETROZ, *Ann. chim. et phys.*, (2) 40 (1829) 213.
[76] A. PENNA, M. A. IORIO, S. CHIAVARELLI AND G. B. MARINI-BETTÒLO, *Gazz. chim. ital.*, 87 (1957) 1165.
[77] W. VON PHILIPSBORN, H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 38 (1955) 1067.
[78] W. VON PHILIPSBORN, H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 913.
[79] A. PIMENTA, M. A. IORIO, K. ADANK AND G. B. MARINI-BETTÒLO, *Gazz. chim. ital.*, 84 (1954) 1147.
[80] E. SCHLITTLER AND J. HOHL, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 29.
[81] H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 30 (1947) 1162.
[82] H. SCHMID AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 512.
[83] H. SCHMID, A. EBNÖTHER AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 1486.
[84] H. SCHMID, K. SCHMID, P. WASER AND A. EBNÖTHER, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 2042.
[85] H. SCHMID, J. KEBRLE AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 1864.
[86] RICHARD SCHOMBURGK, *Travels in British Guiana, 1840–41*.
[87] ROBERT SCHOMBURGK, *Reisen in Guiana und Orinoco, 1835–39*, Leipzig, 1841.
[88] H. WIELAND, W. KONZ AND R. SONDERHOFF, *Ann.*, 527 (1937) 160.
[89] H. WIELAND AND H. J. PISTOR, *Ann.*, 536 (1938) 68.
[90] H. WIELAND, H. J. PISTOR AND K. BÄHR, *Ann.*, 547 (1941) 140.
[91] H. WIELAND, K. BÄHR AND B. WITKOP, *Ann.*, 547 (1941) 156.
[92] TH. WIELAND AND H. MERZ, *Ber.*, 85 (1952) 731.
[93] TH. WIELAND AND H. MERZ, *Ann.*, 580 (1953) 204.
[94] TH. WIELAND, H. FRITZ AND K. HASSPACHER, *Ann.*, 588 (1954) 1.
[95] B. WITKOP, *Angew. Chem.*, 55 (1942) 85.

Received March 10th, 1958

EIN BEITRAG ZUR DIRECTPHOTOMETRIE VON PAPIERCHROMATOGRAMMEN MIT HILFE EINES EINFACHEN EXTINKTIONENSCHREIBERS QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON AMINOSÄUREN

JEAN BARROLLIER, JOHANNA HEILMANN UND EUGEN WATZKE
Hauptlaboratorium der Schering A.G., Berlin-West (Deutschland)

Bei Papierchromatogrammen und -elektropherogrammen liegt der Gedanke nahe, auf die bisher vielfach geübte Elution der gefärbten Zonen und anschliessende Colorimetrie der Eluate zu verzichten und statt dessen die Papierstreifen selbst photometrisch auszuwerten. Diese Auswertung läuft auf eine Colorimetrie auf dem intakten Streifen hinaus, den man sich in eine Vielzahl von schmalen Streifchen zerlegt denken kann, die den Küvetten eines Colorimeters entsprechen und nacheinander colorimetriert werden. Stellt man die farbigen Zonen eines Papierchromatogramms oder elektropherogramms als Extinktionskurven dar, so folgt nach dem Lambert–Beer'schen Gesetz Proportionalität von Inhalt der Kurvenflächen und Substanzmenge in den betreffenden Zonen.

Neuerdings findet die Directphotometrie, besonders bei Elektropherogrammen, zunehmend Interesse und es sind bereits einige Geräte im Handel, welche Extinktionskurven schreiben. Als Beispiele seien genannt der Zeiss-Extinktionenschreiber und der Elphor-Integraph von Bender und Hobein. Beide arbeiten nach dem Kompensationsprinzip unter Verwendung eines logarithmischen Graukeils bzw. einer logarithmisch geschnittenen Blende. GRUBHOFER[1] erreicht das gleiche Ziel auf einem anderen Wege. Er misst den Photostrom mit einem Spiegelgalvanometer, wobei die Galvanometerlichtmarke mit Hilfe eines Kurvenspiegels derart abgelenkt wird, dass eine der Extinktion entsprechende Anzeige entsteht. Die schwierig zu berechnende Spiegelkurve hat er nach einem Näherungsverfahren ermittelt und danach einen Spiegel schleifen lassen. Die Extinktionskurve wird halbautomatisch geschrieben, indem man die Wanderung der Lichtmarke auf einem Transparenzpapier mit der Hand nachzeichnet.

Wir haben unabhängig davon und gleichzeitig denselben Weg beschritten, wobei wir den Kurvenspiegel durch Biegen eines verspiegelten Stahlbandes herstellen. Unter Verwendung im Handel befindlicher Bauelemente, wie Spiegelgalvanometer, Nachlaufschreiber und Chromatometer von B. Lange, haben wir ein vollautomatisches Gerät zum Schreiben von Extinktionskurven gebaut. Der einzige von uns selbst hergestellte Teil ist der Kurvenspiegel. Wir haben unseren Extinktionenschreiber so aufgebaut, dass keine feinmechanische Präzisionsarbeit nötig ist.

Von einer Berechnung der Spiegelkurve haben wir bewusst Abstand genommen

Literatur S. 445.

und den Kurvenspiegel an Hand empirischer Daten justiert. Wir verwendeten dabei einen Stufenkeil mit bekannten Absorptions- und Extinktionswerten. Die Spiegelkurve wurde rein zeichnerisch, ohne geometrische Konstruktion dargestellt, um den Verlauf der Spiegelkurve zu veranschaulichen. Diese Kurve dient dazu, die Ausgangslage für die eigentliche Justierung des Stahlbandes festzulegen.

In der Praxis ist der Extinktionsbereich von 0–1.0 von Interesse. Wir haben uns daher auf diesen Messbereich beschränkt, wie es auch beim Zeiss-Extinktionenschreiben und dem Gerät von GRUBHOFER geschehen ist. Prinzipiell kann der Bereich der Schreibung auch auf höhere Extinktionen ausgedehnt werden.

Zeichnung der Spiegelkurve

Man kann sich die Spiegelkurve aus einer Vielzahl von kleinen, ebenen Spiegeln zusammengesetzt denken, die als Tangenten der exacten Spiegelkurve anliegen. Der jeweilige Berührungspunkt der Tangenten ist zugleich der Punkt, wo der Lichtstrahl des Galvanometerspiegels auf den Kurvenspiegel auftrifft. Da es sich bei den Spiegelkurven um schwach gekrümmte und stetige Kurven handelt, so sind für benachbarte Spiegelelemente die Tangentenabschnitte vom Berührungspunkt bis zu ihrem Schnittpunkt angenähert gleich (AC = CB). Diese Näherungsannahme, zusammen mit dem Spiegelgesetz, gestattet die Elementarspiegel in einem geschlossenen Kurvenzug (Spiegelkurve) aufzustellen.

Zunächst ist er noch insofern unbestimmt, als sich der Verlauf der Spiegelkurve als abhängig vom Kurvenbeginn, d.h. der Lage des ersten Elementarspiegels, erweist

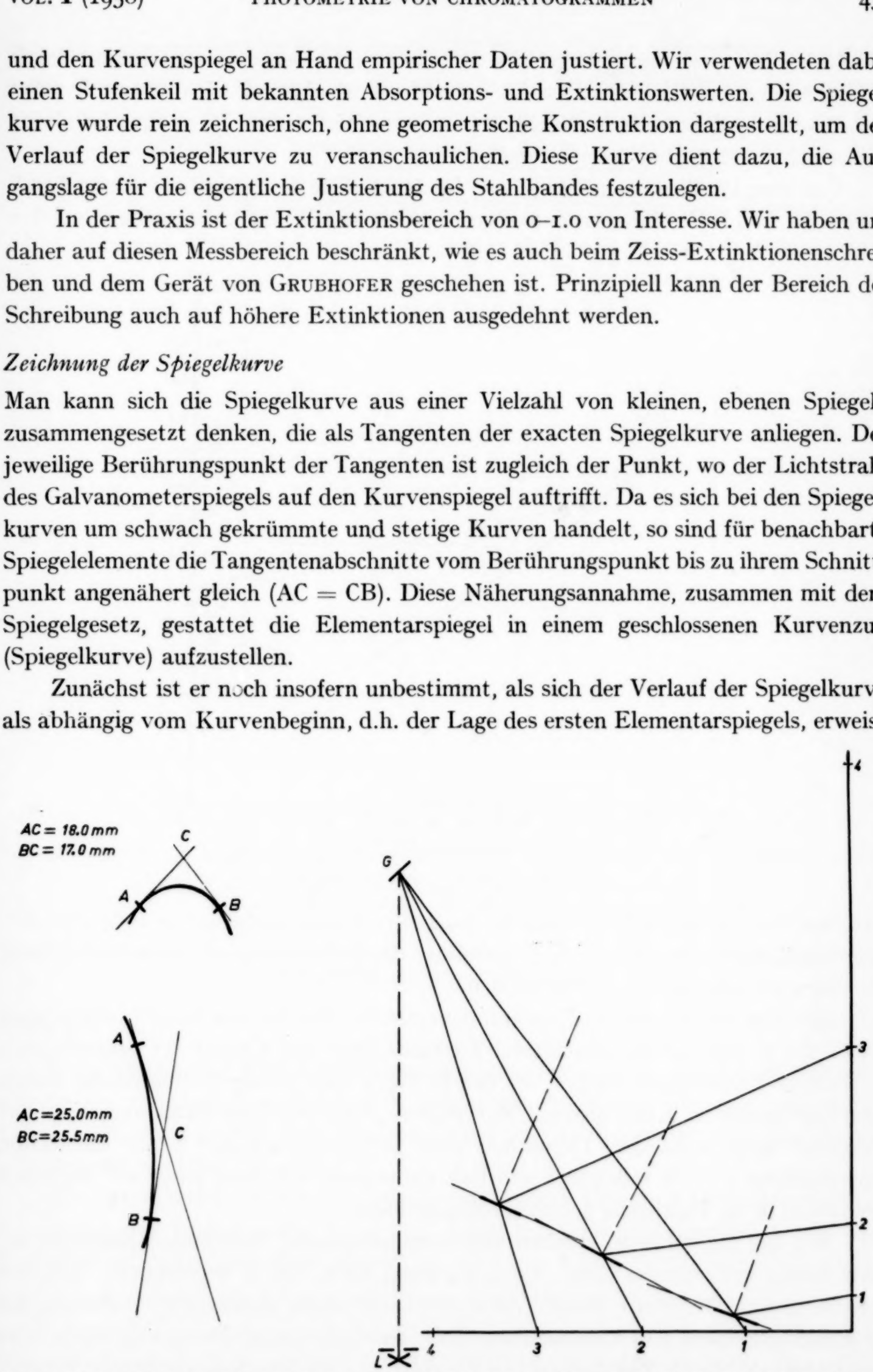


Fig. 1. *Links*: Die Tangentenabschnitte AC und BC sind annährend gleich. *Rechts*: Zeichnerische Darstellung der Lage der Elementarspiegel der Spiegelkurve.

Literatur S. 445.

Die Unbestimmtheit dieser Lage wird auf einen engen Bereich eingeschränkt durch die Forderung, dass der reflektierte Lichtstrahl nur mit einer 20° nicht übersteigenden Parallaxe in die Photozelle des Nachlaufschreibers einfallen darf. Diese Einschränkung ergibt sich aus dem Bau der Photozelle.

Von einer Parallaxe von etwa 5°–10° für den Anfang der Spiegelkurve ausgehend, haben wir mit Hilfe eines durchsichtigen Lineals und Winkeltransporteurs auf den

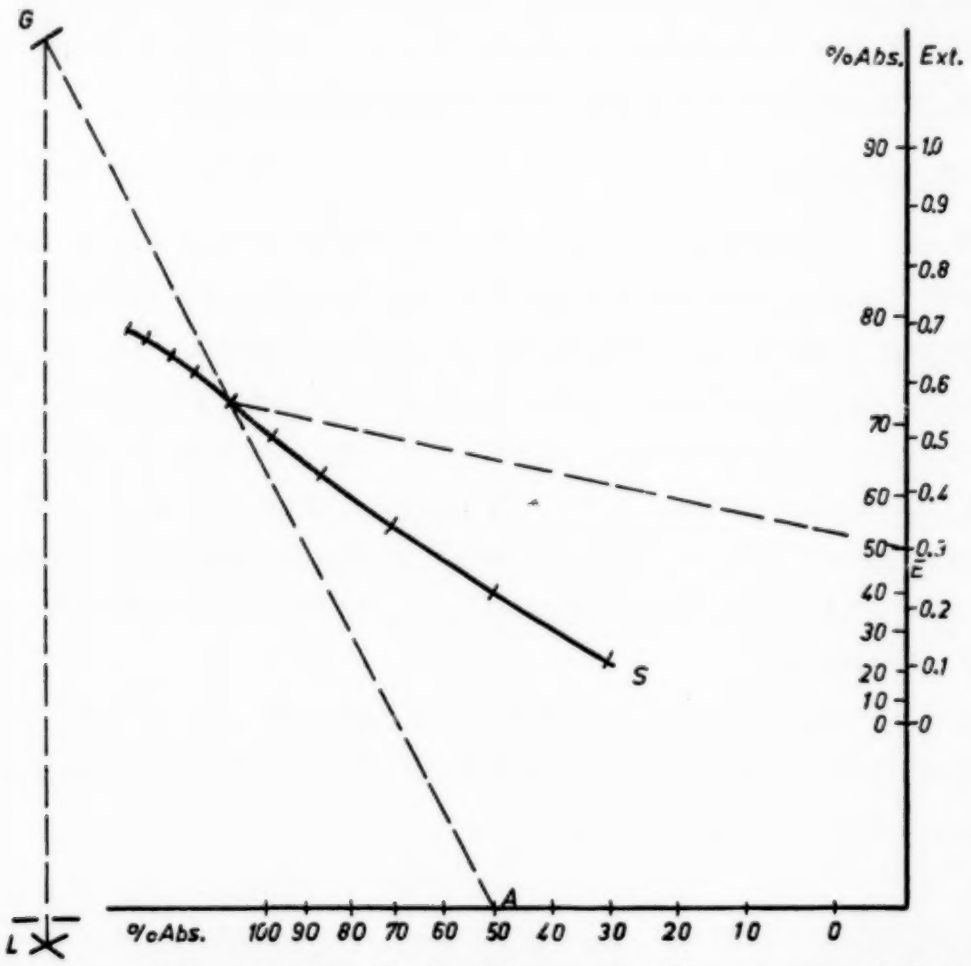


Fig. 2. Aufstellung von Galvanometer G, Spaltlampe L, Kurvenspiegel S, Absorptions- und Extinktionsskala. 1. Aufstellungsart.

Strahlen des Galvanometerspiegels die Lagen der Elementarspiegel so aufgezeichnet, dass obige Bedingungen, nämlich Erfüllung des Reflexionsgesetzes und Gleichheit der Tangentenabschnitte, erfüllt werden.

Die Aufstellung von 10 Elementarspiegeln im Bereich von 0–90% Absorption ($E = 0$–1.0) gibt bereits ausreichend Auskunft über den Verlauf der Spiegelkurve.

Obige Forderungen werden von den in Fig. 2 und 3 dargestellten Anordnungen von Galvanometer, Kurvenspiegel und Skalen erfüllt. Der vom Galvanometerspiegel zunächst nach A fallende Lichtstrahl wird vom Kurvenspiegel S der Extinktion entsprechend nach E reflektiert und fällt dabei stets mit einer unter 20° liegenden Parallaxe in die Photozelle des Nachlaufschreibers.

Wie bei GRUBHOFER, ergeben sich unsymmetrische, S-förmige Spiegelkurven. Wir haben bei unserem Gerät die Aufstellung nach Fig. 2 verwirklicht, weil uns hierbei in einfacher Weise, durch Teilung des Lichtstrahls, gleichzeitige Steuerung des Nachlaufschreibers und Beobachtung der Absorptionsskala ermöglicht wird. Dies erleichtert die durch Regulierung des Photostroms der Messzelle erfolgende Einstellung des Galvanometerausschlags auf die Skalenlänge (s.u.).

Literatur S. 445.

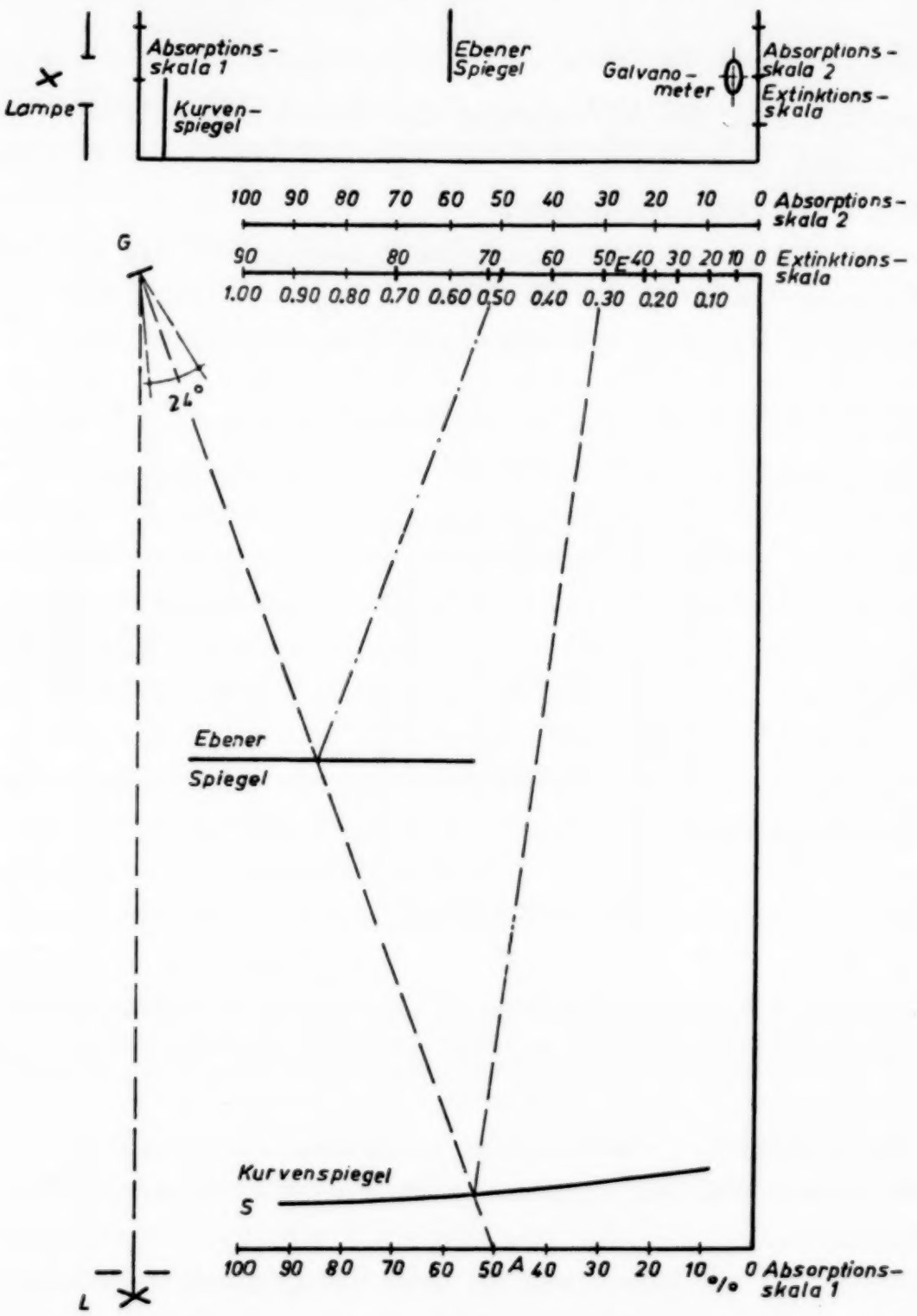


Fig. 3. Aufstellung von Galvanometer G, Spaltlampe L, Kurvenspiegel S, Absorptions- und Extinktionsskala. 2. Aufstellungsart.

Stufenkeil

Die Eichung und Justierung unseres Geräts erfolgte an Hand eines Stufenkeils. Wir haben uns denselben angefertigt, indem wir 10 Streifen aus 0.05 mm dicker Lupolenfolie treppenartig über einander legten und die Enden der einzelnen Folien mit einander verschweissten.

Absorption und Extinktion wurden für jede Stufe im Unicam bei 500 mμ gemessen.

Daten des Keils: Breite = 4.0 cm; Länge = 15 cm; Länge/Stufe = 1.5 cm; Länge bis zur Schweissstelle = 25 cm.

Stufe	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*
% Absorption	21	38	50.5	61.3	69.8	75.5	80.9	85.0	87.2	89.8
Extinktion	0.103	0.206	0.306	0.412	0.518	0.610	0.720	0.820	0.899	0.990

Literatur S. 445.

Aufstellung des Geräts

Fig. 4 veranschaulicht die Vereinigung der Bauelemente (Photometerbank = I, Galvanometer und Kurvenspiegel = II, Nachlaufschreiber = III) zu einem vollautomatischen Extinktionenschreiber.

I. Photometerbank. Als Photometerbank haben wir das mit einer Selenzelle arbeitende Chromatometer 3b der Fa. Bruno Lange verwendet. Das Chromatogramm wird hier auf einem Schlitten, der von einem Synchronmotor bewegt wird, unter der

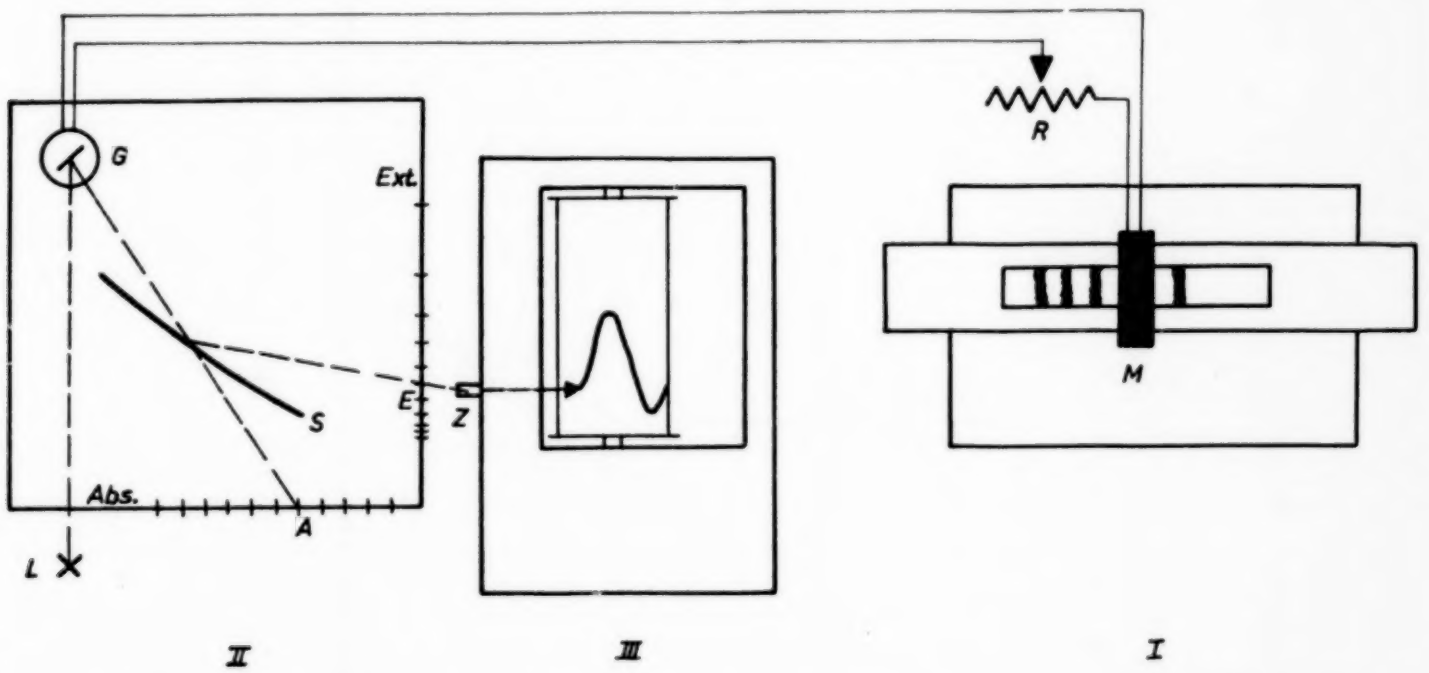


Fig. 4. Zusammenstellung der Bauelemente (schematisch). I = Photometerbank mit Photomesszelle M; II = Spiegelvorrichtung mit Galvanometer G, Spaltlampe L, Kurvenspiegel S; III = Nachlaufschreiber mit Photozelle Z zum Steuern der Schreibfeder.

Photozelle vorbeigeführt. Schlittenlänge = 40 cm, Spaltbreite = 1 mm, Spaltlänge (variabel) bis 40 mm. Der Vorschub ist in Stufen wählbar; 2.8 cm/min haben sich als günstig erwiesen.

Für unseren Zweck haben wir an dem Chromatometer einige Abänderungen vorgenommen:

(a) Um in monochromatischem Licht messen zu können, haben wir einen Halter für Interferenzfilter (50 × 50 mm) zwischen Lampe und Spalt eingebaut. Wir benutzen die Doppellinienfilter (DIL) von Schott u. Gen., Mainz.

(b) Wir ersetzen in dem Chromatometer die 4 Volt-Einfadenlampe (8 W) durch die kleine Osram-Soffittenlampe No. 6452 (6 V, 15 W), die über einen Netzstabilisator betrieben wird.

(c) Der Spalt wird mit einer matten Perlonfolie unterlegt, um das Licht leicht diffus zu machen.

(d) Die hochklappbare Photozelle M muss bei der Messung stets die gleiche Lage einnehmen. Wir sichern dies durch Anbringen eines Anschlags an der Photozelle M.

(e) Von der Photozelle muss sorgfältig alles Nebenlicht ferngehalten werden. Da die angebrachte Vorrichtung ("Vorspalt") dafür nicht ausreicht, decken wir die Photozelle noch zusätzlich mit einem schwarzen Tuch ab.

II. Galvanometer und Kurvenspiegel. Das Galvanometer G, der Kurvenspiegel S

und die Lampe L für die Lichtmarke werden auf einer schweren, auf Weichgummipuffern ruhenden Aluminiumgrundplatte erschütterungsfrei aufgestellt.

(a) Das hoch stromempfindliche Galvanometer, Type SSG 11 von Ruhstrat, hat eine Stromkonstante $c_i = 3.5\text{–}5.0 \cdot 10^{-9}$ mA/mm/m, einen inneren Widerstand $R_g =$ 1000 Ω und eine Schwingungsdauer von 0.6–0.88 sec.

(b) Die Lichtmarke liefert uns eine Quecksilberdampflampe (Osram HgQS 500, 120 W), die in einem gekühlten Gehäuse brennt. In dem Mantel dieses Gehäuses wurde ein 5 cm langer und 3 mm breiter Spalt ausgespart. Es entsteht eine kräftige Lichtmarke, welche den Nachlaufschreiber gut steuert. Es kann natürlich jede andere Lichtquelle verwendet werden, die eine genügend kräftige Lichtmarke gibt.

(c) Für den Kurvenspiegel wird ein 25–30 cm langes, 2 cm breites und 0.4–0.5 mm starkes Federstahlband verwendet, das auf Hochglanz poliert und anschliessend verchromt wird. Es wird auf einem Block in solcher Höhe montiert und justiert, dass die Lichtmarke des Galvanometers halbiert wird. Die obere Hälfte des Lichtstrahls fällt direct nach A auf die Absorptionsskala, die untere Hälfte wird der Extinktion entsprechend nach E reflektiert und steuert dort den Nachlaufschreiber.

Der biegsame Spiegel wird von kleinen Winkeln festgehalten. Durch Verschieben dieser Winkel auf der Unterlage wird beim Justieren das spiegelnde Band zu der Spiegelkurve gebogen und in dieser Lage fixiert.

(d) Die Absorptions- und Extinktionsskalen (s. Fig. 2 und 4) werden auf mattierten Plexiglasstreifen aufgezeichnet.

III. Nachlaufschreiber. Wir benutzen den Nachlaufschreiber nach Wilhelmi der Fa. Bruno Lange mit einer Schreibbreite von 20 cm. Nachdem der Messbereich auf Extinktionen von 0–1.0 beschränkt wurde, entspricht 1 cm Schreibhöhe einer Extinktion 0.05.

Die Wechsel-Radgetriebe sind in Chromatometer und Nachlaufschreiber derart auf einander abgestimmt, dass der Vorschub von Chromatogramm und Registrierpapier mit gleicher Geschwindigkeit oder in einem wählbaren Geschwindigkeitsverhältnis erfolgen kann. In den meisten Fällen werden gleiche Vorschubsgeschwindigkeiten erwünscht sein.

Regelwiderstand. R ist ein im Galvanometerkreis liegender Regelwiderstand, der in Grob- und Feinregulierung (1.3 MΩ + 10 kΩ) unterteilt ist. Er dient zur Abstimmung des von Spaltlänge und Transparenz des Chromatogramms abhängigen Photostroms auf den der Absorption bzw. Extinktion 0 entsprechenden Galvanometerausschlag.

Justierung des Kurvenspiegels

Die Absorptions- und Extinktionswerte des für die Justierung benutzten Stufenkeils wurden bei 500 mμ gemessen. Dementsprechend muss das Interferenzfilter für die Wellenlänge 500 mμ in das Chromatometer eingesetzt werden.

Zunächst zeichnet man die Extinktionsskala (0–1.0) auf und legt die Endpunkte der Absorptionsskala, 0 und 100% Absorption, willkürlich fest. Wir haben beide Skalen 20 cm lang gemacht.

Literatur S. 445.

Man legt den Stufenkeil auf den Schlitten des Chromatometers und stellt die Länge des Spaltes der Messzelle M der Breite des Stufenkeils entsprechend ein. Zunächst lässt man die Messzelle unbeleuchtet und stellt die Lichtmarke des stromlosen Galvanometers auf der Absorptionsskale auf den Fixpunkt 100% ein. Ohne den Keil unter die Messzelle zu bringen, wird dann die Spaltbeleuchtung im Chromatometer ein-

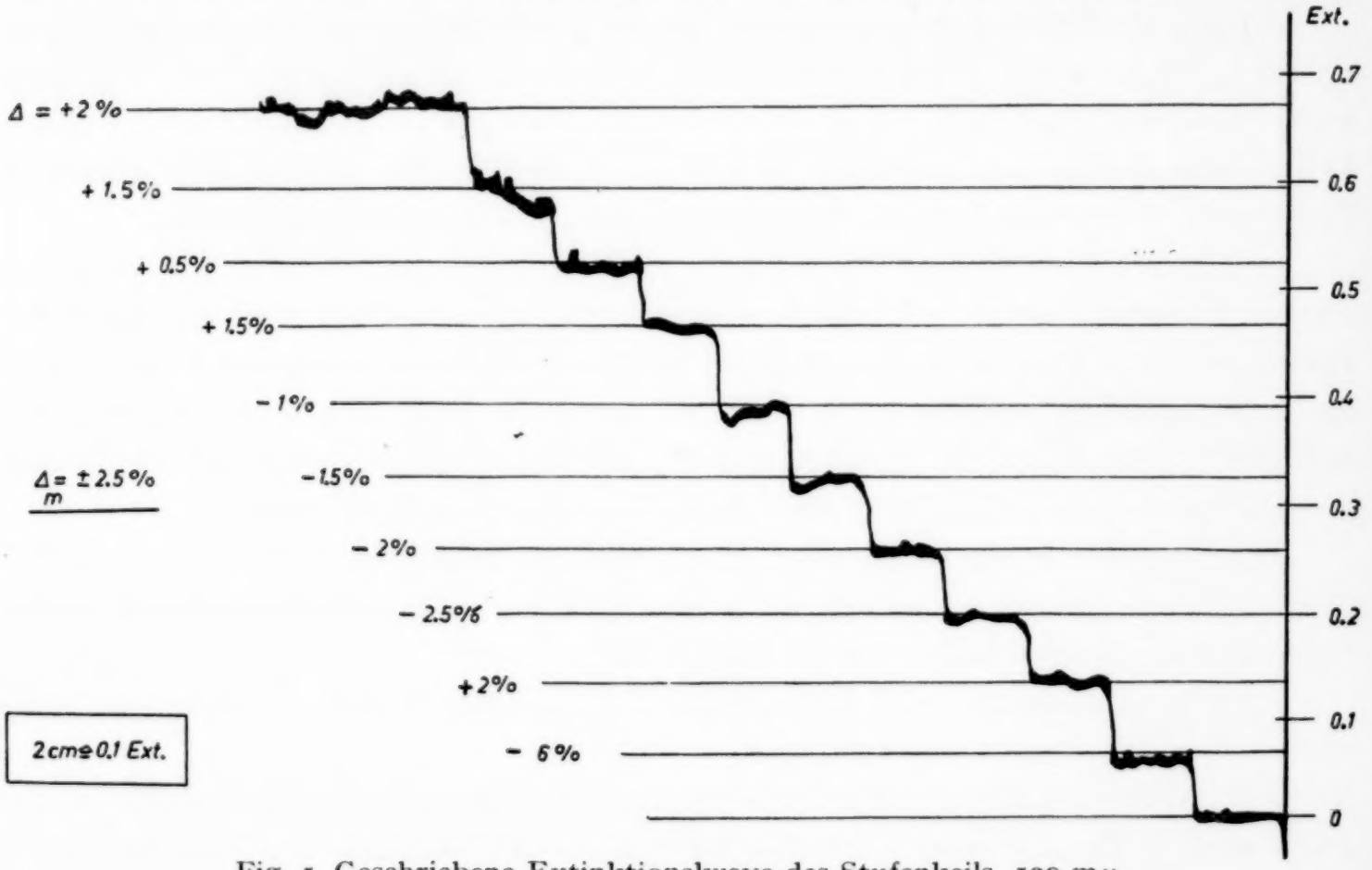


Fig. 5. Geschriebene Extinktionskurve des Stufenkeils. 500 mμ.

geschaltet und der Photostrom mit dem Widerstand R so reguliert, dass die Lichtmarke jetzt auf dem anderen Fixpunkt 0% steht. Anschliessend wird der Stufenkeil durchgezogen und für jede der bekannten Absorptionen die Lage der Lichtmarke angezeichnet. Die Absorptionsskala ist nicht linear, sondern folgt im Prinzip einer tg-Funktion. Da wir mit einem Galvanometerausschlag bis zu 28° arbeiten, macht sich die Verdrillung des Spannbändchens zusätzlich bemerkbar. Es war daher vorzuziehen auch die Absorptionsskala auf Grund empirischer Daten zu eichen.

Das Spiegelband wird zunächst in der zeichnerisch ermittelten (s. Fig. 2), annähernd richtigen Lage aufgestellt. Die eigentliche Justierung erfolgt, indem man unter Regulierung des Photostroms mit dem Widerstand R die Absorptionsskala Punkt für Punkt abtastet. Dabei wird jeweils durch Verschieben der Haltewinkel die Lage des betreffenden Spiegelabschnitts derart corrigiert, dass der reflektierte Teil der Lichtmarke auf den Absorption entsprechenden Punkt der Extinktionsskala fällt. Es ist vorteilhaft bei der Justierung vom Wendepunkt der Spiegelkurve, der bei 60% Absorption liegt, auszugehen. Mit 15 Winkelpaaren lässt sich das spiegelnde Stahlband in der Spiegelkurve festlegen.

Zur Kontrolle der Justierung wurde mit dem Apparat anschliessend die Extinktionskurve des Stufenkeils geschrieben (Fig. 5). Bei unserem modellmässig aufgestellten Gerät beträgt die mittlere Abweichung von den Sollwerten $\pm$ 2.5%.

Literatur S. 445.

Registrierung der Extinktionskurve

Das Chromatogramm wird in bekannter Weise transparent gemacht und auf den Schlitten des Chromatometers gelegt. Die Länge des Spaltes der Messzelle wird auf die Breite der auszuwertenden Zonen eingestellt. GRASSMANN UND HANNIG[2] haben gezeigt, dass nur unter dieser Voraussetzung quantitativ auswertbare Extinktionskurven erhalten werden. Wenn die gefärbten Zonen die Länge des Spalts nicht ausfüllen, werden zu niedrige Extinktionen registriert. Dieser Fehler hängt von der Verteilung des Farbstoffs über die Spaltlänge sowie von der Grösse der Extinktion ab. Bei höheren Extinktionen wird der Fehler sehr erheblich.

Bevor die Spaltbeleuchtung der Messzelle eingeschaltet wird, kontrolliert man die Lage der Lichtmarke des Galvanometers. Sie soll auf 100% Absorption stehen; nötigenfalls wird die Stellung des Galvanometerspiegels korrigiert. Dann bringt man eine ungefärbte Stelle des Chromatogramms unter den Spalt der Photozelle, schaltet die Spaltbeleuchtung ein und stellt die Lichtmarke durch Regeln des Photostroms mit dem Widerstand R auf 0% Absorption ein.

Jetzt werden die Motore für die Registriertrommel des Nachlaufschreibers und den Vorschub des Chromatogramms in Gang gesetzt und die Extinktionskurve geschrieben.

Quantitative Auswertung der Extinktionskurven

Wir planimetrieren unsere Kurven durch Ausschneiden und Wägen der Papierstücke.

Die Proportionalität von Dosis und Extinktionskurvenfläche wurden an Modellelektropherogrammen des Farbstoffs Neucoccin nachgeprüft.

Zunächst wurde der einer Kolorimetrie in Lösung entsprechende, optimale Fall untersucht, bei dem die farbigen Zonen auf völlig durchsichtigem Untergrund stehen. Die Testpherogramme wurden durch Elektropherieren des Farbstoffs in Agargel hergestellt. Als Träger für die Gelschicht diente Tesa- oder Cellophanfolie. Nach dem Trocknen erhält man die Pherogramme als klar durchsichtige Filme. Es wurden genau dosierte Mengen Farbstofflösung in bekannter Weise in Filterpapierstreifchen aufgesaugt und diese auf das Gel gelegt. Durch Wahl von Streifenbreite und Farbstoffkonzentration wurde dabei die Gestalt der Extinktionskurven variiert, so dass nach Wunsch hohe und schmale neben niedrigen und breiten Kurven erhalten wurden.

Fig. 6 zeigt die lineare Beziehung zwischen Dosis und Extinktionskurvenfläche.

Nachfolgend sei auf einen Punkt hingewiesen, der unseres Wissens bei der directen photometrischen Auswertung von Pherogrammen bisher noch nicht beachtet wurde.

Bei transparent gemachten Papieren beobachtet man einen Einfluss des Transparenzgrades auf die Höhe der Extinktionskurven. Diesen Effekt veranschaulicht Fig. 7. Sie zeigt die Extinktionskurven eines Testpherogramms auf Whatman No. 1, bei dem nacheinander durch Einbetten in Flüssigkeiten von verschiedenem Brechungsexponenten unterschiedliche Grade der Lichtdurchlässigkeit hergestellt wurden.

I = eingebettet in α-Bromnaphthalin, n_D^{20} 1.6587; Durchlässigkeit bei 500 mμ = 2.1%.

Literatur S. 445.

II = eingebettet in Paraffinöl, n_D^{20} 1.4812; Durchlässigkeit bei 500 mμ = 4.8%.

III = eingebettet in Transparenzöl (200 ml α-Bromnaphthalin + 250 ml Paraffinöl, n_D^{20} 1.5599; Durchlässigkeit bei 500 mμ = 17.4%.

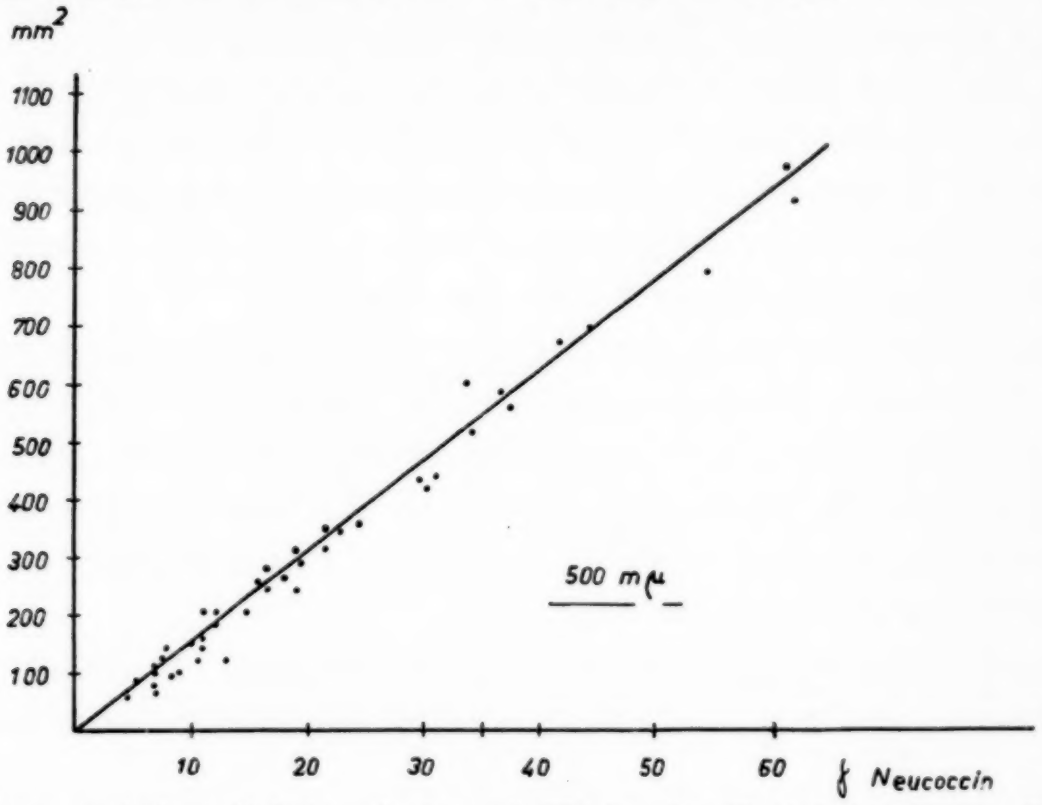


Fig. 6. Beziehung zwischen Substanzdosis und Fläche der Extinktionskurve. Testsubstanz = Neucoccin.

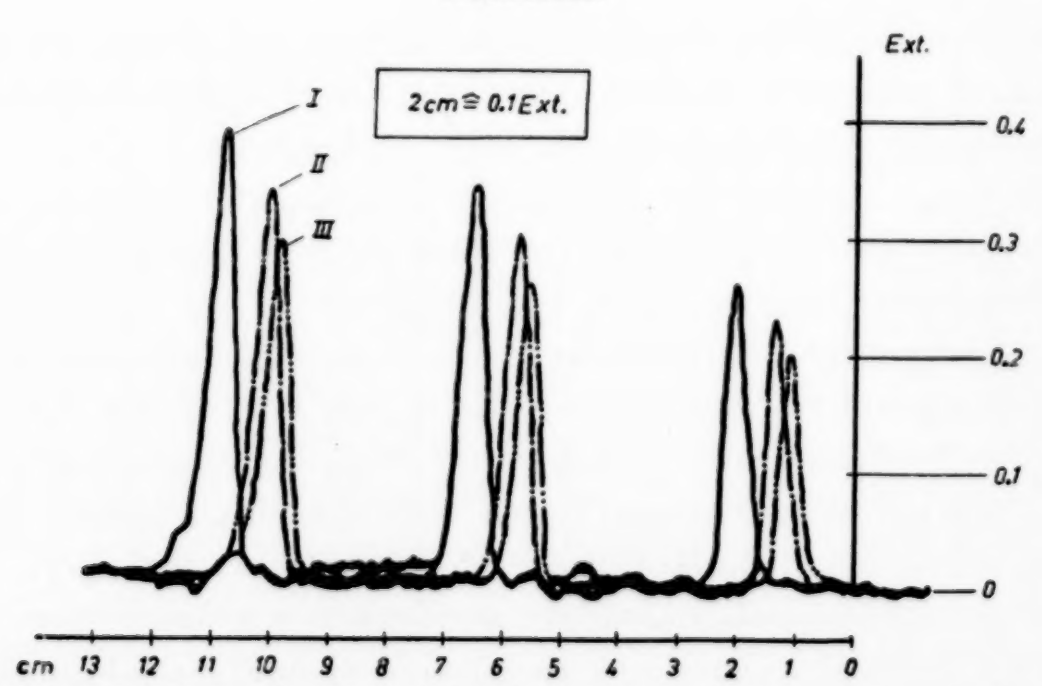


Fig. 7. Abhängigkeit der Höhe der Extinktionskurven vom Transparenzgrad des Papiers. Testpherogramm bei verschiedenen Graden der Lichtdurchlässigkeit ausgemessen. Testsubstanz = Neucoccin. 500 mμ. I = 2.1% Durchlässigkeit; II = 4.8% Durchlässigkeit; III = 17.4% Durchlässigkeit.

Zum Vergleich seien die Durchlässigkeiten von Glas, Cellophanfolie und nicht transparent gemachtem Whatmanpapier bei 500 mμ angeführt:

Whatman No. 1, 0.15 mm dick; Durchlässigkeit = *ca.* 0.1%
Glas, 2 mm dick; Durchlässigkeit = 84%
Cellophanfolie, 0.04 mm dick; Durchlässigkeit = 87.5%

Die Kurven der Fig. 7 zeigen deutlich, dass mit abnehmender Transparenz des

Papieruntergrundes höhere Extinktionen registriert werden. Dies erklärt sich durch die bei geringerer Transparenz stärker in Erscheinung tretenden Lichtbrechungen und -reflektionen an den Papierfasern; mit abnehmender Transparenz wird der Weg des durchfallenden Lichtstrahls im Papierfilz verlängert; die Elementarküvetten werden scheinbar dicker.

Bei gleichbleibendem Transparenzgrad des Papieruntergrundes gilt jedoch die Proportionalität von Dosis und Extinktionskurvenfläche (Tabelle I).

TABELLE I

Neucoccindosis	*Kurve I* *Transparenz = 2.1%*		*Kurve II* *Transparenz = 4.8%*		*Kurve III* *Transparenz = 17.4%*	
	mm²	*mm²/γ Neucoccin*	*mm²*	*mm²/γ Neucoccin*	*mm²*	*mm²/γ Neucoccin*
6.4 γ	262	41	192	30	176	27.6
9.55 γ	360	38	294	31	256	26.8
11.75 γ	478	40.7	382	32	335	28.5
i.M.		39.9		31.0		27.6

Zonenbreite = Spaltlänge = 38 mm; 500 mμ.
Die Kurvenflächen I sind 44% grösser als die Kurvenflächen III.

Da es schwierig ist die Lichtdurchlässigkeit der Papiere mit der notwendigen Genauigkeit zu reproduzieren, sind die Extinktionskurvenflächen verschiedener Chromatogramme oder Pherogramme für quantitative Bestimmungen nicht unmittelbar mit einander zu vergleichen.

Wir tragen daher auf den auszuwertenden Papierstreifen nachträglich eine genau dosierte Menge eines Farbstoffs, dessen Absorptionsmaximum mit der auszuwertenden Färbung überein stimmt, der Zonenbreite entsprechend als Strich auf und nehmen dessen Extinktionskurvenfläche als Bezugsgrösse für die quantitative Bestimmung. Es ergeben sich Umrechnungsfaktoren, welche das Verhältnis der Kurvenflächen für gleiche Dosen Bezugsfarbstoff und Substanz angeben; sie sind unabhängig von Unterschieden in der Transparenz des Papiers und den sich daraus ergebenden Unterschieden in der Höhe der registrierten Extinktionen.

Der Einfluss des Transparenzgrades des Papiers auf die Höhe der registrierten Extinktionen nimmt mit steigender Lichtdurchlässigkeit der geölten Papiere stark ab und macht sich bei hoher Lichtdurchlässigkeit nicht mehr störend bemerkbar. Ein solcher Fall liegt z.B. bei hochacetylierten Papieren vor, die in Paraffinöl 60% Lichtdurchlässigkeit erreichen. Bei diesen ist die Beziehung auf einen Farbstoff überflüssig; vielmehr kann die Substanzmenge direct in Beziehung zur registrierten Kurvenfläche gesetzt werden. Dem Extinktionskoeffizienten der Absolutkolorimetrie entspricht in diesem Falle eine bestimmte, konstante Fläche der Extinktionskurve bei Einheitsbedingungen, d.h. bei 1 γ Substanz, verteilt auf 1 cm Spaltlänge. Der zahlenmässige Wert dieser Fläche, die man "specifische Extinktionskurvenfläche" nennen könnte, hängt natürlich vom Massstab der Extinktionsschreibung ab.

Auswertung von Aminosäurechromatogrammen

Die Chromatogramme werden in bekannter Weise hergestellt, wobei sich nach

Literatur S. 445.

unseren Erfahrungen besonders harte Papiere, wie z.B. Schleicher u. Schüll 2045 aM und agl gut bewähren. Als Laufmittel bevorzugen wir Propanol–Ameisensäure–Wasser (75:13:12) und ähnliche Lösungsmittelsysteme. Die Auftrennung der langsam wanderden Aminosäuren ($R_F < 0.5$) wird durch mehrmaliges Laufenlassen des Chromatogramms sehr verbessert.

Gut auswertbare Färbungen erzielen wir mit dem von uns angegebenen Ninhydrin–Cd-Reagens[3,4]; die Farbe entwickelt sich in 24 Stunden bei Zimmertemperatur vollständig und beginnt erst nach weiteren 24 Stunden merklich abzublassen. Das Chromatogramm ist sorgfältig vor allen Ammoniakspuren aus der Raumluft zu schützen, sonst entstehen störende Rotfärbungen des Papieruntergrundes.

Als günstigen Dosierungsbereich fanden wir 0.3–1.2γ an einzelner Aminosäure/cm Startlinie.

Da bei der Chromatographie von Aminosäuren normale Cellulosepapiere angewendet werden, die in Transparenzöl nur mässige Lichtdurchlässigkeit, etwa 17%, erreichen, ist es notwendig, bei der photometrischen Auswertung die Extinktionskurven auf einen Standardfarbstoff zu beziehen. Bei der Ninhydrin–Cd-Färbung der Aminosäuren ist Neucoccin dafür geeignet. Die genau dosierte Farbstoffmenge wird nach der Ausfärbung der Aminosäurezonen als Strich aufgetragen; Dosis 8–10 γ/cm.

Zum Transparentmachen verwenden wir α-Bromnaphthalin–Paraffinöl (200:250). Das Chromatogramm muss luftblasenfrei und völlig in Transparenzöl eingebettet zwischen die Glasplatten des Chromatometerschlittens gebracht werden. Es ist falsch, das getränkte Chromatogramm vor Auflegen auf den Chromatometerschlitten zwischen Filterpapier abzulöschen, weil dabei die Lichtdurchlässigkeit auf 2.5–3% herabsinkt und zudem die Gefahr einer ungleichmässigen Transparenz längs des Papierstreifens besteht.

Mit genau dosierten Modellchromatogrammen wurde für die einzelnen Aminosäuren der "Neucoccinfaktor" ermittelt, d.h. der Faktor für die Umrechnung von Neucoccin auf die betreffende Aminosäure. Er ist das Verhältnis der Dosen von Aminosäure und Neucoccin, welche gleiche Extinktionskurvenflächen geben.

$$x = \frac{A \times y}{N} \times F_N$$

x = gesuchte Aminosäuremenge
A = Fläche der Aminosäurekurve
N = Fläche der Neucoccinkurve
y = Neucoccindosis
F_N = Neucoccinfaktor

Wir haben die Neucoccinfaktoren für 15 Aminosäuren ermittelt und gefunden, dass sie sich in Gruppen aufteilen. Ein Zusammenhang mit der chemischen Konstitution der Aminosäuren ist dabei nicht zu erkennen.

Ähnliche Unterschiede zeigen sich auch in den Extinktionskoeffizienten, wenn der Farbstoff aus dem Papier mit Methanol eluiert und kolorimetriert wird. Der Fehler liegt bei der directen photometrischen Auswertung der Chromatogramme bei $\pm$ 6%; bei der Kolorimetrie des Farbstoffs im methanolischen Eluat fanden wir einen durchschnittlichen Fehler von $\pm$ 5%.

Literatur S. 445.

$F_N \approx 0.06$	$F_N \approx 0.1$	$F_N \approx 0.14 - 0.16$	$F_N = 0.19$
Ala	Glu	Asp	His
Ser	Leu	Gly	
Val	Ileu	Phe	
	Lys	Tyr	
	Met		
	Orn		
	Thre		

Schwierigkeiten macht sowohl bei der Directphotometrie als auch bei der Kolorimetrie des eluierten Farbstoffs die Bestimmung von Gly. Bei der Auswertung der Extinktionskurven liegt die Fehlerbreite für Gly bei $\pm$ 10%. Die Elution des von Gly mit dem Ninhydrin–Cd-Reagens gebildeten Farbstoffs mit Methanol gelingt nur sehr unvollständig, so dass der Fehler bei der Kolorimetrie dieses methanolischen Extrakts eher noch grösser ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine einfache Apparatur zum Schreiben der Extinktionskurven von Chromatogrammen und Pherogrammen beschrieben, die zum grössten Teil aus bekannten, käuflichen Geräten aufgebaut ist. Der einzige zusätzliche Teil ist ein elastisches, verspiegeltes Stahlband, das derartig zu einer Kurve gebogen wird, dass die von diesem Kurvenspiegel reflektierte Lichtmarke des Galvanometers die Extinktion anzeigt. Die Wanderung der Lichtmarke wird von einem Nachlaufschreiber als Extinktionskurve registriert.

Mit diesem Gerät wird an der quantitativen Bestimmung von Aminosäuren die Directphotometrie von Chromatogrammen demonstriert, wobei zugleich die experimentellen Bedingungen für derartige quantitative Bestimmungen angegeben werden.

SUMMARY

A simple apparatus is described with which the extinction curves of chromatograms and pherograms can be traced. It is constructed for the greater part from well-known commercial instruments, the only additional part consisting of a mirror made from a flexible steel band, which is bent into such a curve that a galvanometer light-spot reflected from this curved mirror indicates the extinction. The movement of the light-spot is registered as an extinction curve by means of a recorder.

The quantitative determination of amino acids is given as an example of direct photometry of chromatograms with this apparatus. The experimental conditions for such quantitative determinations are also discussed.

LITERATUR

[1] N. GRUBHOFER, *Z. Naturforsch.*, 11b (1956) 44.
[2] W. GRASSMANN UND K. HANNIG, *Z. physiol. Chem.*, 290 (1952) 1.
[3] J. BARROLLIER, *Naturwiss.*, 42 (1955) 416.
[4] J. HEILMANN, J. BARROLLIER UND E. WATZKE, *Z. physiol. Chem.*, 309 (1957) 219.

Eingegangen den 2. April 1958

A NOTE ON THE OBSTRUCTIVE OR TORTUOSITY FACTOR IN PAPER ELECTROPHORESIS

J. T. EDWARD

Chemistry Department, McGill University, Montreal (Canada)

KUNKEL AND TISELIUS[1], in a classical study of paper electrophoresis, found the mobilities of ions in moist paper to be given by their mobilities in free solution multiplied by a "correction factor", which for reasons given below we have termed the "obstructive factor" ϱ^2. On the basis of an admittedly oversimplified model for the filter paper soaked with solution, they considered that

$$\varrho = l/l' \tag{1}$$

where l and l' are the lengths of paths available to the ions in free solution and in moist paper respectively (see below). In this communication it is shown that, assuming this model, a more rigorous and detailed treatment leads to the relation

$$\varrho = (l/l')^2 \tag{2}$$

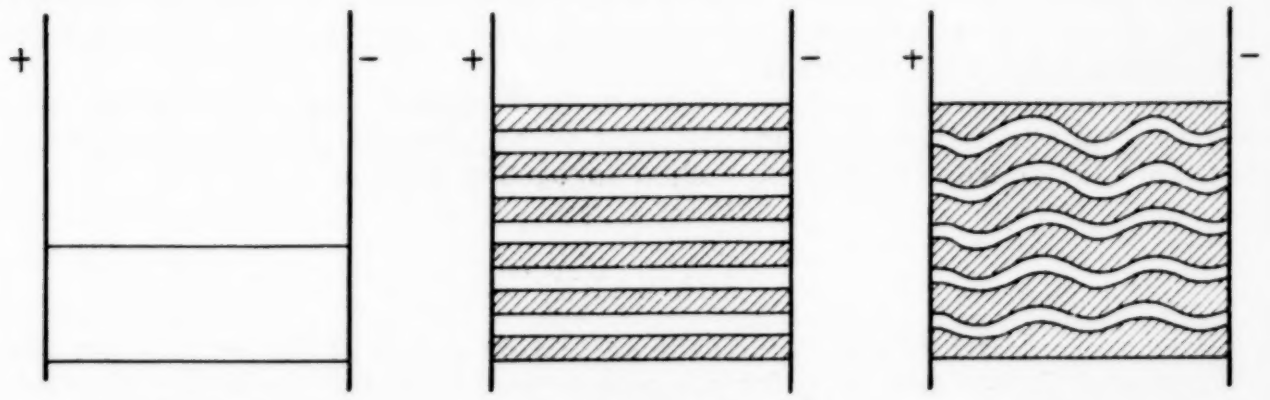


Fig. 1 Fig. 2 Fig. 3

Fig. 1. Solution between electrodes.
Fig. 2. Solution dispersed in a non-conducting solid (diagonal shading) in straight channels between the electrodes.
Fig. 3. Solution dispersed in a non-conducting solid in sinuous channels between the electrodes.

We consider a column of solution (Fig. 1), of specific conductance k, cross-sectional area A, and volume V, between electrodes a distance l apart. The conductance K of this solution is given by

$$K = \frac{kA}{l} = \frac{kV}{l^2} \tag{3}$$

This volume of solution is now dispersed in a fixed volume V_p of non-conducting solid between electrodes remaining a distance l apart (Figs. 2 and 3). The conductance K' of the solid + dispersed solution will depend on its geometry. In Fig. 2 the solution is contained in n channels, each of uniform cross-section A/n, volume V/n, and conductance kV/nl^2. Hence $K' = K$. We now envisage a process in which, while V and V_p remain constant, the channels are lengthened to l' but still run through the block of

References p. 448.

solid without intersecting with each other (Fig. 3). (This represents the model of KUNKEL AND TISELIUS for the solution held in the porous filter paper.) Since the volume in each channel remaines V/n, the cross-sectional area must decrease to $(A/n)\,(l/l') = A'n$, A' being the total effective cross-sectional area of the solution in the n channels. The conductance in each channel is now kA'/nl', and the total conductance K' will be less than K and given by

$$K' = \frac{kA'}{l'} = \frac{kV}{l'^2} \tag{4}$$

Since ϱ has been defined[2] by

$$\varrho = K'/K \tag{5a}$$

$$= K'l^2/kV \tag{5b}$$

it follows from equations 3 and 4 that *for the model depicted in Fig. 3*

$$\varrho = (l/l')^2 \tag{6}$$

KUNKEL AND TISELIUS considered l' to equal $R'Ak$, where $R' = 1/K'$. However, from equation (4) it follows that

$$l' = R'A'k = R'Ak\,(l/l') \tag{7}$$

Hence the "correction factors" which they determined for various filter papers, defined by

$$\text{"Correction factor"} = \frac{l}{R'Ak} \tag{8}$$

will for the model of Fig. 3 equal $(l/l')^2$ and not l/l' as they supposed.

It should be noted that the obstructive factor as defined in equation (5b) is identical with the "correction factor" as defined in equation (8), and is operationally defined. Hence it does not depend on the conceptual model adopted for the filter paper–solution system. The actual model represented in Fig. 3 is highly artificial; ϱ may be decreased further by having channels of length l' but of varying cross-sectional area; by reversible adsorption of the ions by the paper, etc. Consequently, it seems preferable to designate this factor by the non-committal term "obstructive factor", rather than by more specific terms such as "correction factor for added migration path length".

The mobility (velocity in unit potential gradient) u of an ion in free solution (Fig. 1) is defined by the equation

$$u = \frac{dl}{tE} \tag{9}$$

where d is the distance travelled by the ion in time t in a potential gradient E/l (*i.e.* E is the potential difference between the electrodes). The actual mobility of the ion will be unchanged in the system of Fig. 3, but the apparent distance d_p that it will travel in the same time with a potential difference E between the electrodes is given by

$$d_p = d(l/l')^2 = d\varrho \tag{10}$$

This is because (a) the true potential gradient in the channels of Fig. 3 is E/l', E/l representing the macroscopic or *apparent* potential gradient, and (b) the macroscopic distance d_p travelled by the ion is less than the actual distance in the winding channel by a factor l/l' (see KUNKEL AND TISELIUS[1] for the detailed argument). Then if we

References p. 448.

define the "mobility in paper" u_p of an ion by its apparent velocity (d_p/t) when the apparent potential gradient along the paper (E/l) is unity, *i.e.*,

$$u_p = \frac{d_p l}{tE} \tag{11}$$

it follows from equation (9) and (10) that

$$\varrho = u_p/u \tag{12}$$

While this equation has been derived on the basis of the simple model of Fig. 3, it can be shown to hold generally for solutions having non-conducting solids dispersed through them. The conductance K of the column of solution of Fig. 1 depends on the number and mobilities u_1, u_2, u_3... of the ions between the electrodes. For solutions of completely ionized substances the changed conductance K' produced by adding to the solution non-conducting liquid or solid (the distance l between the electrodes remaining unchanged) can only be due to the changed mobilities of the constituent ions, specific interactions between the ions and diluent being excluded. Hence

$$\varrho = \frac{K'}{K} = \frac{u_{p1} + u_{p2} + u_{p3} + \cdots}{u_1 + u_2 + u_3 + \cdots} \tag{13}$$

If, as assumed by KUNKEL AND TISELIUS, the mobilities of all ions are affected equally by the dispersed solid, then

$$\varrho = \frac{u_{p1}}{u_1} = \frac{u_{p2}}{u_2} = \frac{u_{p3}}{u_3} = \cdots \tag{14}$$

which is identical with equation (12).

SUMMARY

On the basis of the model of KUNKEL AND TISELIUS, the factor by which the mobilities of ions are reduced when the solutions containing them are absorbed by filter paper is shown to be proportional to $(l/l')^2$, where l and l' are the lengths of the paths followed by the ions in free solution and in moist paper respectively.

REFERENCES

[1] H. G. KUNKEL AND A. TISELIUS, *J. Gen. Physiol.*, 35 (1951) 89.
[2] R. CRAWFORD AND J. T. EDWARD, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 1543.

Received April 2nd, 1958

CALCULATION OF THE ZONE MOBILITIES OF ALIPHATIC AMMONIUM IONS IN PAPER ELECTROPHORESIS

J. T. EDWARD* AND R. CRAWFORD
Chemical Laboratory, Trinity College, Dublin (Ireland)

KUNKEL AND TISELIUS[1] suggested that the mobility u of an ion in a column of solution is reduced to u_p when the column is absorbed by a strip of filter paper of the same length, so that

$$u_p = \varrho u \qquad (1)$$

where ϱ (< 1) is an "obstructive factor" characteristic of the paper strip. Methods of determining ϱ have been described[2]. The zone mobility u_z of the same ion may be defined as the velocity (corrected for electroendosmotic flow[1]) of an observable zone of the ion in a paper strip moistened with a solution of other ions (the background electrolyte) when the apparent potential gradient[3] along the strip is unity. It has been shown[3] that $u_z \approx u_p$ when the amount spotted on the paper to form the zone is small, and when the conductance of the background solution is high. Then under these conditions

$$u_z/\varrho \approx u \qquad (2)$$

However, when the specific conductance of the background solution is low, u_p and u_z may be expected to diverge[3]. Because the conditions of concentration, etc., in the area of the zone are so ill-defined, it is impossible at the moment to delimit the conditions under which equation (2) is valid. It consequently becomes of interest to test it for ionic zones and background solutions of varying nature and concentration. Such a test is also implicitly a test of the hypothesis of KUNKEL AND TISELIUS[1], which has been generally[4,5] but not universally[6] accepted.

In the present work we have attempted to do this by observing the velocities of zones of monovalent and divalent ammonium ions in strips of Whatman No. 3 paper kept at 25°. These ions were chosen because they have widely differing mobilities[7], but are all easily revealed by a ninhydrin spray. The distances travelled by the ionic zones were corrected for the electroendosmotic flow of the solution, as revealed by the movement of a zone of N-β-hydroxyethyl-2,4-dinitroaniline[8] from the starting line. From a consideration of the pK_a values of related compounds[9], the pK_a of this conveniently coloured water-soluble compound may be estimated as about —3. Hence it should not be appreciably ionized in the most strongly acidic background solution used in this work[9]. This was confirmed by experiments with tetramethyl glucose[10] as neutral marker substance, which showed the same electroendosmotic flow. On the other hand, *s*-trinitrobenzene[11] was an unsatisfactory marker substance in aqueous solution, having an R_F of less than 1.00.

* Present address: Department of Chemistry, McGill University, Montreal, Canada.

References p. 456.

In each experiment the value of ϱ for the paper strip was determined by an empirical equation[2], and u_z/ϱ (termed the "experimental mobility") compared with u.

EXPERIMENTAL

Materials

The amines, all commercial products, were used in 1% ethanolic solution. It was necessary to add a few drops of acetic acid to dissolve hexadecyl- and octadecylamine completely. A 1% solution of N-β-hydroxyethyl-2,4-dinitroaniline in 50% aqueous ethanol was used as neutral marker substance.

Electrophoretic procedure

A procedure essentially similar to that of KUNKEL[12] was employed for preparing the paper and applying 2-μl samples of amine and marker solutions, using weighed strips, 57.1 × 12.0 cm, of Whatman No. 3 paper and weighed glass plates, 50.8 × 15.0 cm. The paper–glass plate "sandwich" was held tightly by screw clamps between brass plates (49.0 × 15.2 cm) of FOSTER'S design[10], kept at 25.0 ± 0.5° by circulating water. An attempt was made to tighten the clamps each time to the same extent. The protruding ends of the paper strips dipped into 600 ml of electrolyte solution in two plastic vessels, connected by agar–potassium chloride bridges with two beakers of saturated sodium chloride solution containing carbon electrodes. The levels in the two plastic vessels were equalized by a siphon connection.

The paper was allowed to equilibrate for 20 min. Separate experiments showed that during this time a flow of solution from each vessel towards the centre of the strip became complete[11,12], and the temperature of the paper became steady[2]. The siphon was then removed. Two thin strips of aluminum foil were clamped across the paper strip immediately beside each end of the glass plates (*i.e.* 50.8 cm apart), and were connected to a Model 40 Universal Avometer. The D.C. potential applied to the carbon electrodes was adjusted to maintain a constant potential difference across the 50.8 cm strip of paper of 400 ± 5 V, and thus an apparent potential gradient of 7.88 ± 0.10 V/cm. The current varied with the concentration of background electrolyte, but was usually less than 10 mA. It was shown in separate experiments with a thermocouple in contact with the paper that such a current would lead to a temperature difference of less than 0.5° between the paper and the brass plates.

After 30–70 min, the current was stopped, the ends of the paper strip protruding beyond the glass plates were torn off, and the moist paper and glass plates were weighed. The absorbance a (in ml/g) of the paper strip was calculated in the manner described previously[2], and thence the obstructive factor ϱ from the equation:

$$\varrho = \frac{a - 0.21}{a + 0.67} \tag{3}$$

Under the conditions of our experiments the absorbance varied within narrow limits, being 1.55 ± 0.10 ml/g in 29 out of 31 experiments, corresponding to ϱ values of 0.60 ± 0.02.

References p. 456.

The paper was removed from between the glass plates, dried, sprayed with a 1% ethanolic solution of ninhydrin containing a few drops of quinoline, and heated. The distances between the centres of the blue zones of the amines and a line drawn through the centres of zones of marker substance were measured, and the zone mobilities u_z (in cm^2 $volt^{-1}$ sec^{-1}) and experimental mobilities u_z/ϱ thence calculated. The latter are shown plotted as experimental points in Figs. 1, 3 and 4.

RESULTS AND DISCUSSION

Although most of the amines were applied to the paper in the free form and not as salts, their zone mobilities in dilute background solutions of hydrochloric acid and potassium chloride were almost the same (Fig. 1). This unexpected result indicated

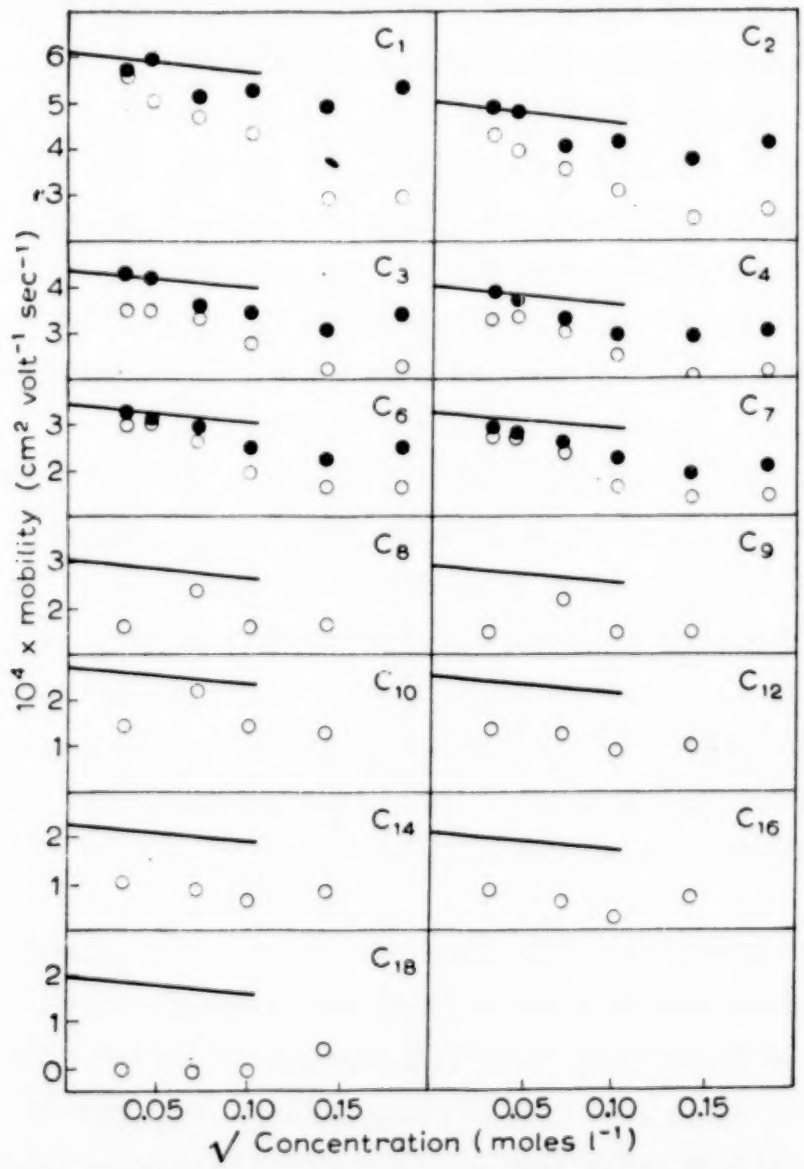


Fig. 1. Mobilities of alkylammonium ions, from methyl- (C_1) to octadecyl-ammonium (C_{18}), in various concentrations of aqueous hydrochloric acid (open circles) and potassium chloride (closed circles). Curves show mobilities calculated from equation (4).

that protonation of the amines in the latter solution rapidly became complete. A mechanism for this protonation is indicated in Fig. 2. The original amine solutions had concentrations of about 0.3–0.03 *M*, which in the spots on paper would become diluted twenty fold or more[3]. At this dilution the amines are 10–30% ionized according to the equation:

$$RNH_2 + H_2O \rightleftharpoons RNH_3^+ + OH^-$$

References p. 456.

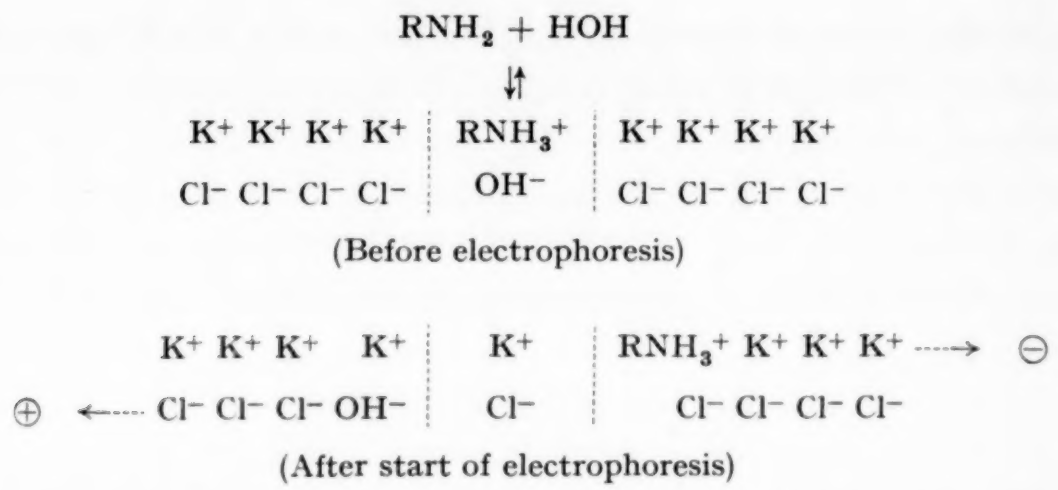

RNH2 + HOH
K+ K+ K+ K+ | RNH3+ | K+ K+ K+ K+
Cl− Cl− Cl− Cl− | OH− | Cl− Cl− Cl− Cl−
(Before electrophoresis)
K+ K+ K+ K+ | K+ | RNH3+ K+ K+ K+ ⊖
⊕ Cl− Cl− Cl− OH− | Cl− | Cl− Cl− Cl− Cl−
(After start of electrophoresis)

Fig. 2. Schematic representation of changes during electrophoresis of a spot of aliphatic amine in background potassium chloride solution.

The movement of RNH_3^+ and OH^- away from each other and from uncharged RNH_2 (Fig. 2) evidently enables ionization to go to completion.

In moderately concentrated (over 0.01 N) solutions of hydrochloric acid or potassium chloride, the zones of ammonium ions were round and well-defined; with more dilute solutions they became, as expected[3], elongated in the direction of the current. With the most dilute solutions the zones were ill-defined, and these zone mobilities are likely to have the largest experimental errors. The theoretical mobilities u, given by the curves in Fig. 1, were calculated from the equation

$$u = u_o - (30.16 + 0.2605\, u_o F)\sqrt{I}/F \qquad (4)$$

where u_o is the mobility in infinitely dilute solution. This is a form of the Onsager equation[13] giving the effect of the ionic strength I of a solution containing only univalent ions on the mobility of one ionic species in water at 25°, and holds to within about 1% for concentrations up to 0.01 N. We have assumed I equal to the concentrations of the background solutions, although the ionic strengths in the zones of ammonium ions were probably slightly greater[3]. Values of u_o for the methylammonium[14], ethylammonium[15], propylammonium[15] and dodecylammonium[16] ions were calculated from equivalent conductances in the literature, and values for the other ions from an empirical equation[7].

In view of the various possible sources of error, the experimental mobilities of the smaller monovalent ammonium ions in low concentrations of background electrolyte (Fig. 1) agreed reasonably well with the theoretical mobilities. However, they were lower than theoretical in the more concentrated background solutions of hydrochloric acid (Fig. 1). It is possible that for these solutions equation (3) yields erroneous values of ϱ. The equation was derived from a study[2] of the conductances of paper strips soaked with solutions of neutral salts, in which the cellulose swelled so that its non-conducting volume increased by about 15%. Possibly with strong hydrochloric acid solutions the swelling is greater, and hence ϱ smaller, than indicated in equation (3); a further investigation of the equation for these solutions is indicated.

Attempts to measure the zone mobilities of divalent ammonium ions (M^{++}) in various concentrations of background hydrochloric acid failed because of excessive streaking of the zones. This is probably explained by the fact that even in very dilute

References p. 456.

solutions, divalent ions have a strong tendency to form ion-pairs with ions of opposite charge[13]:

$$M^{++} + Cl^- \rightleftharpoons MCl^+$$

Because of its reduced charge, the mobility of MCl^+ will be about half that of M^{++}. Assuming the concentration of Cl^- within the zone of M^{++} to be about the same as in the rest of the paper, the concentration of M^{++} will be highest at the edges, and of MCl^+ at the centre of the zone. Consequently, the amine at the front edge of the zone should migrate forward more rapidly than the amine at the centre. On the other hand, the rapidly moving M^{++} from the back edge of the zone will move into the more concentrated region of the centre and tend there to form MCl^+. This would explain the "streaking forward" appearance of the zone.

The sharp drop in experimental mobilities in 0.001 *N* hydrochloric acid for monovalent ions larger than heptylammonium, and in 0.005 *N* acid for monovalent ions larger than decylammonium (Fig. 1), is due to reversible adsorption of the ions

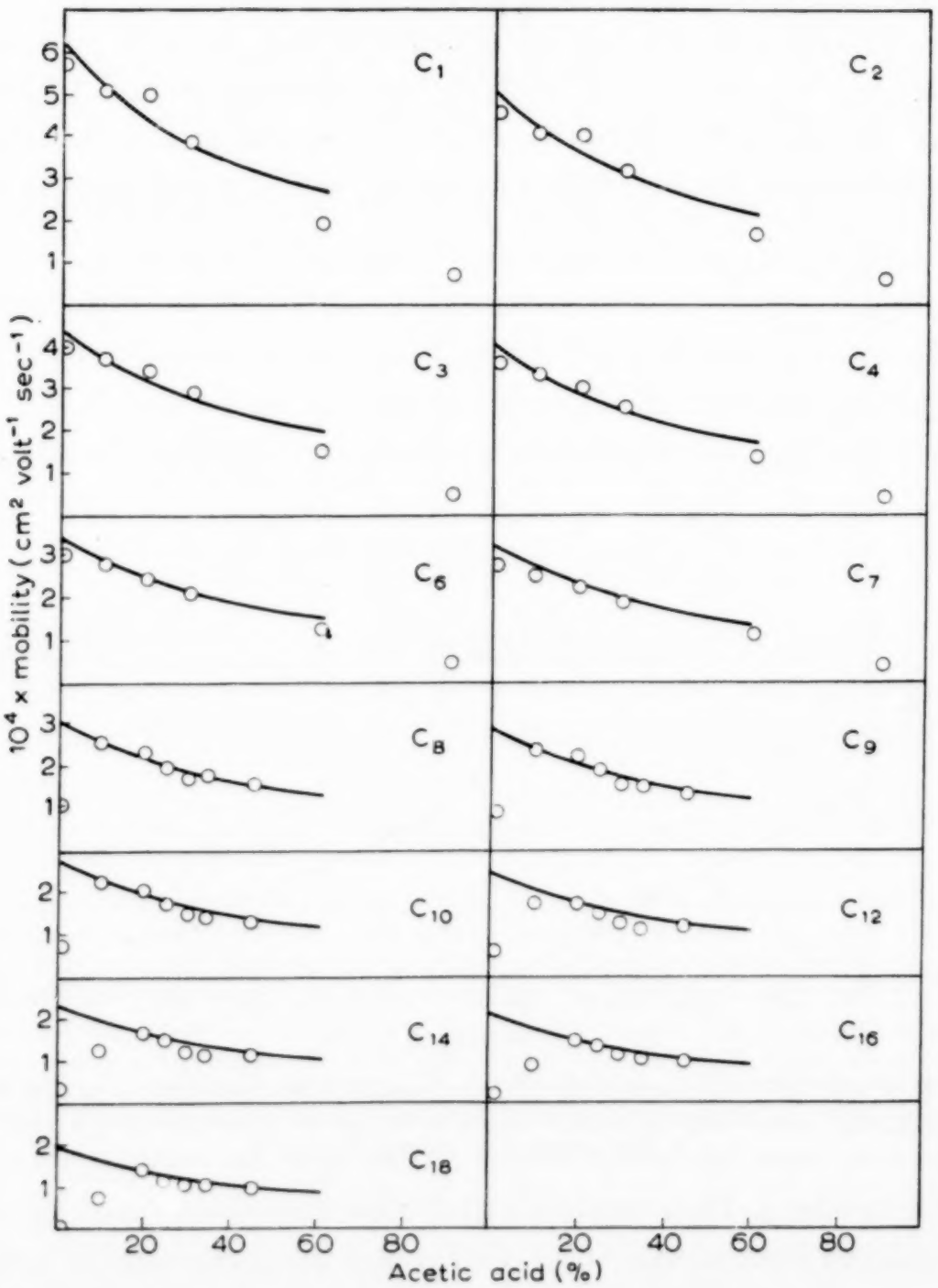


Fig. 3. Mobilities of alkylammonium ions in various concentrations of aqueous acetic acid. Curves calculated from equation (5).

References p. 456.

by the paper[17,18]. This was shown by the use of strong aqueous acetic acid solutions, which are known to prevent adsorption of long chain ions[18]. Because of the changes in dielectric constant, etc., the calculation of ionic mobilities in these media by the Onsager equation is difficult. However, even fairly concentrated solutions are of low ionic strength, and so the curves giving the theoretical mobility u_a (Fig. 3) have been calculated from the equation

$$u_a \eta_a = u_o \eta_o \tag{5}$$

where η_o and η_a are the viscosities of water and of the aqueous acetic acid solutions at 25°[19], the effect of ionic strength being ignored. The experimental mobilities are in rough agreement with this curve for concentrations of acetic acid up to about 50%; in stronger solutions interionic effects prevent equation (5) from being even approximately correct. Over the whole range of concentrations studied, the points to a good approximation lie on straight-line curves given by the empirical equation

$$u_a = u_o (1 - 0.01\, a) \tag{6}$$

where a is the percentage of acetic acid in the solution.

In 1% acetic acid solution adsorptive effects become noticeable with the octylammonium ion; in 10% acetic acid, with dodecylammonium ion. In 20% acetic acid these effects are not perceptible with the octadecylammonium ion, the largest ion tested.

Divalent ammonium ions travelled as round, well-defined spots in aqueous acetic

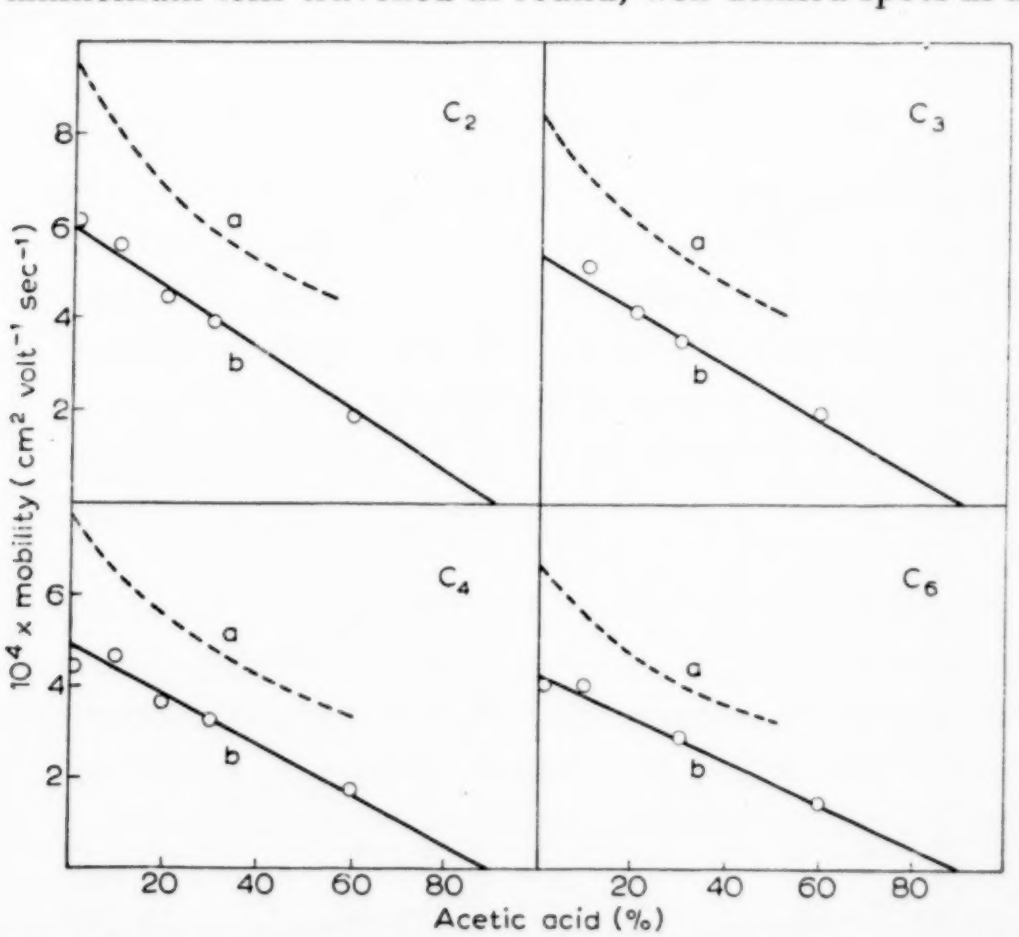


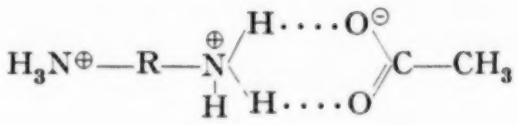
Fig. 4. Mobilities of ethylene- (C_2), trimethylene- (C_3), tetramethylene- (C_4), and hexamethylenediammonium (C_6) ions in various concentrations of aqueous acetic acid. Theoretical curves: *a*, equation (5); *b*, equation (7).

acid. As shown in Fig. 4, their experimental mobilities were considerably lower than mobilities calculated from equation (5), and in fact fitted reasonably well the empirical equation

$$u_a = 0.64\, u_o (1 - 0.011\, a) \tag{7}$$

References p. 456.

Thus even in the most dilute background solution, the mobilities of the ions were less than two-thirds the theoretical mobility in infinitely dilute solution in water. This indicates that even in these solutions of low ionic strength, the divalent ammonium ions have a strong tendency to form ion-pairs with acetate ions; these ion-pairs of the general formula



may derive added stability from hydrogen-bonding[18] as shown. It is possible that in solutions of weak electrolytes such as acetic acid the difference in degree of ion association for the inner and outer zones of polyvalent ions, postulated above for hydrochloric acid solutions, is not found, and hence the zones travel as round spots. It is difficult to envisage the exact mechanism of this "levelling effect", but further work on the mobilities of polyvalent ions in background solutions of weak electrolytes would be desirable. It is interesting to note that SLUYTERMAN[20] found that a background solution of 33% aqueous acetic acid (ionic strength about 0.02) gave much more compact spots of the polyvalent ion insulin than did a solution of glycine or citrate buffer.

In summary, the results with various background solutions indicate that if adsorptive effects are avoided, the zone mobilities of ions are proportional to their mobilities in free solution. Since the ions tested differed widely in their sizes, the results support the views of KUNKEL AND TISELIUS[1] as opposed to those of MCDONALD[6]. The "barrier effects" postulated by the latter probably become of importance only when a fine-structured supporting medium such as a gel is used in place of filter paper[21].

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Professor W. COCKER for his support of this work, Dr. D. C. PEPPER for advice and the loan of apparatus, Mr. D. J. PARSONS for preliminary experimental work, and the Medical Research Council of Ireland for financial support.

SUMMARY

In a test of current theories of paper electrophoresis, the mobilities of zones of aliphatic ammonium ions were determined in moist paper between glass plates kept at 25.0° ± 0.5°. Using very dilute solutions of hydrochloric acid or potassium chloride as background electrolytes, the zone mobilities of small monovalent ions were approximately equal to the mobility calculated for the ion in free solution multiplied by an "obstructive factor" due to the paper. Large monovalent ions showed low zone mobilities because of adsorption by the paper. Zones of divalent ions moved in background hydrochloric acid solutions with excessive streaking. Mono- and divalent ions moved in well-defined zones in aqueous acetic acid of varying concentrations; their zone mobilities were given with fair precision by empirical equations taking account of the viscosities of the media.

References p. 456.

REFERENCES

1 H. G. KUNKEL AND A. TISELIUS, *J. Gen. Physiol.*, 38 (1951) 89.
2 R. CRAWFORD AND J. T. EDWARD, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 1543.
3 J. T. EDWARD, *Chem. & Ind. (London)*, (1958) 276.
4 M. LEDERER, *An Introduction to Paper Electrophoresis and Related Methods*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1955, p. 25.
5 R. J. BLOCK, E. L. DURRUM AND G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press, Inc., New York, 1955, p. 356.
6 H. J. MCDONALD, *Ionography*, Year Book Publishers, Chicago, 1955, pp. 60, 78.
7 J. T. EDWARD, *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, 27 (1956) 273; *Chem. & Ind. (London)*, (1956) 929.
8 D. L. MOULD AND R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 58 (1954) 585.
9 M. A. PAUL AND F. A. LONG, *Chem. Revs.*, 57 (1957), 9, 28.
10 A. B. FOSTER, *Chem. & Ind. (London)*, (1952) 1050; *J. Chem. Soc.*, (1953) 982.
11 M. A. JERMYN AND R. THOMAS, *Nature*, 172 (1953) 728.
12 H. G. KUNKEL, in D. GLICK, *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. I, Interscience Publ., Inc., New York, 1954, p. 141.
13 R. A. ROBINSON AND R. H. STOKES, *Electrolyte Solutions*, Butterworths, London, 1955, p. 138.
14 J. H. JONES, F. J. SPUHLER AND W. A. FELSING, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) 965.
15 T. S. MOORE AND T. F. WINMILL, *J. Chem. Soc.*, (1912) 1635.
16 D. W. KUHN AND C. A. KRAUS, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 3676.
17 A. J. G. BARNETT AND D. K. SMITH, *J. Sci. Food Agr.*, 6 (1955) 53.
18 J. T. EDWARD AND R. CRAWFORD, *Chem. & Ind. (London)*, (1956) 1274.
19 P. B. DAVIS AND H. C. JONES, *J. Am. Chem. Soc.*, 37 (1915) 1194.
20 L. A.Æ . SLUYTERMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 169.
21 R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 65 (1957) 266.

Received April 2nd, 1958

THE STUDY OF RHODIUM(III) COMPLEXES BY PAPER ELECTROPHORESIS AND ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

III. RHODIUM(III) IN PERCHLORIC ACID

S. K. SHUKLA

Institut du Radium, Paris (France)

INTRODUCTION

Work has been in progress in this laboratory[1,2], which involved a study of the action of different mineral acids on rhodium(III) hydroxide with the aim of finding a method for the analytical separation of this element. In the acids HCl, HBr, HNO_3 and H_2SO_4 a single species of rhodium(III) could not be found. It was concluded that only partition chromatography might yield a reliable separation of the metal from other platinum metals, and that ion exchange and paper electrophoresis are unreliable.

In this paper an attempt has been made to investigate the possibility of obtaining rhodium as a single species in perchloric acid, taking into consideration its remarkable stability, complete dissociation and extreme reluctance to form co-ordination complexes.

EXPERIMENTAL

(i) *Preparation of rhodium perchlorate*

Rhodium hydroxide was prepared as a yellow precipitate by carefully adding a solution of 2 *N* NaOH to an aqueous solution of Na_2RhCl_5 (Johnson, Matthey and Co., London). The precipitate was washed with distilled water by centrifugation until the wash water was neutral to indicator. The washed precipitate of rhodium hydroxide was dissolved in *N* perchloric acid, whereby a yellow solution was obtained, which did not change colour on standing for several weeks.

The solution was subjected to paper electrophoresis according to the method of LEDERER AND WARD[3], using 3 × 40 cm paper strips (Papeterie d'Arches No. 302) and *N* perchloric acid as electrolyte. After applying a potential of 250 V for 45 min the current was switched off. Rhodium was detected by spraying the paper with a solution of stannous chloride and potassium iodide in 5*N* HCl. Three cationic bands were obtained as shown in Fig. 1a. The slowest band was the weakest in intensity, the second band had a higher intensity, while the most rapid band was the most prominent.

(ii) *Effect of aging*

The solution of rhodium hydroxide in perchloric acid was allowed to stand at room temperature in a stoppered tube. Electrophoresis of the solution after it had stood for

References p. 460.

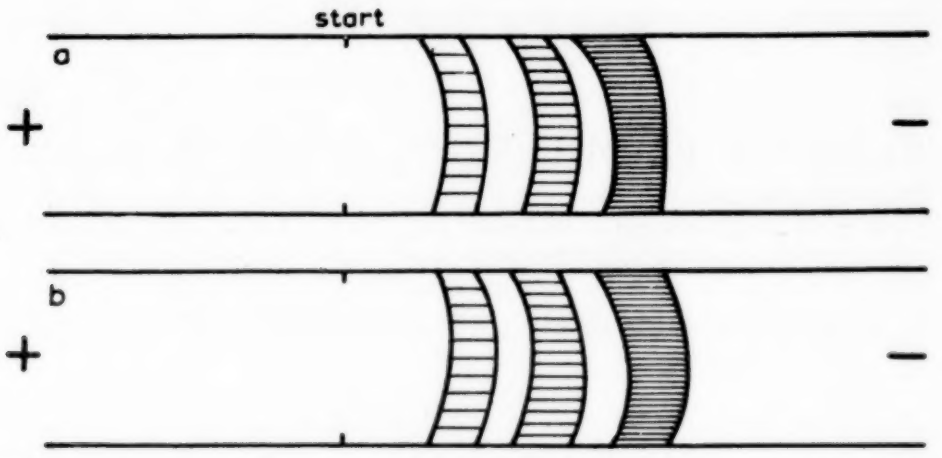


Fig. 1a. Paper electropherogram of a fresh solution of $Rh(OH)_3$ in 1.0 *N* $HClO_4$ (250 V for 45 min, electrolyte 1 *N* $HClO_4$). Fig. 1b. Paper electropherogram of the same solution as in Fig. 1a aged for 1 month in a stoppered tube at room temperature. Conditions as in Fig. 1a.

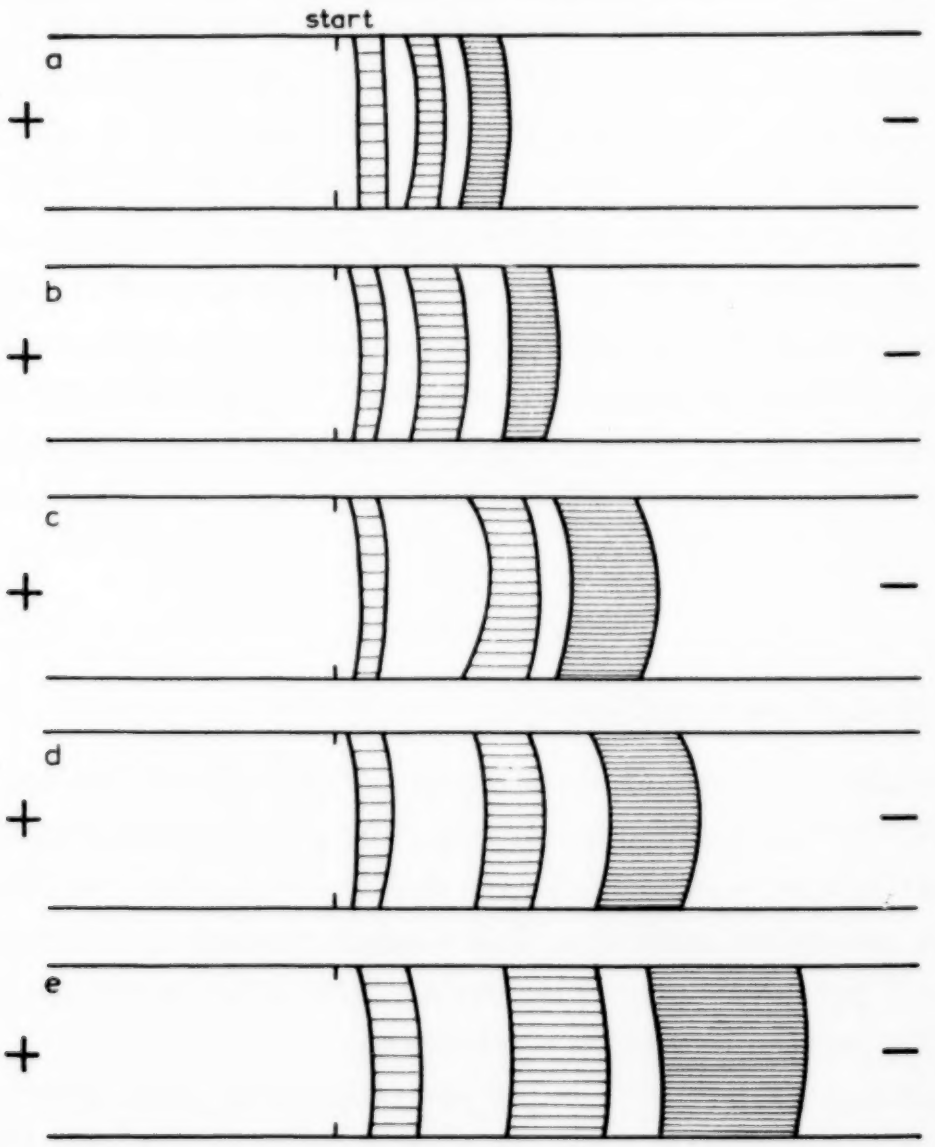


Fig. 2. Paper electropherogram of a fresh solution of $Rh(OH)_3$ in *N* $HClO_4$ (250 V for 45 min), using as electrolyte: (a) 1.5 *N* $HClO_4$, (b) 1 *N* $HClO_4$, (c) 0.75 *N* $HClO_4$, (d) 0.1 *N* $HClO_4$ and (e) 0.05 *N* $HClO_4$.

different lengths of time always gave the same electropherogram as shown in Fig. 1b. This indicates that no appreciable change occurs on aging the solution; this is also indicated by the colour of the solution.

(iii) Effect of the electrolyte concentration

Electropherograms obtained by varying the concentration of the electrolyte used are shown in Fig. 2. The number, the intensity and the relative positions of the three

References p. 460.

bands remained unaltered by dilution of the electrolyte. But with solutions below 1 *N* the bands moved more rapidly. With 0.05 *N* $HClO_4$, the bands became very diffuse so more dilute solutions were not tried.

(iv) Effect of heating the solution

A portion of the rhodium hydroxide solution in $HClO_4$ was heated on a water-bath for 45 min and also over a naked flame for about 5 min and then electrophorized. The three bands were still observed, which indicates the stability of these compounds.

(v) Action of $AgNO_3$

We considered the possibility that the bands observed might contain some co-ordinated chloro-groups, which had been carried with the precipitate to the perchloric solution. A portion of the solution was mixed with $AgNO_3$ in the cold. The mixture still gave three bands on electrophoresis. But, when the mixture was heated on a water-bath for about 45 min and again electrophorized, only a single rhodium band, faster than the second but slightly slower than the third band of the original solution, was repeatedly found. We presume that this band corresponds to the most prominent band, but is somewhat slowed down owing to its high concentration and also to the presence of Ag^+ ions which travel still faster. The first two bands probably contained Cl^- covalently linked to Rh which was removed by heating with $AgNO_3$.

(vi) Ion exchange studies

The nature of the three cationic bands produced by the original solution, and their charges were further studied by ascending chromatography on Whatman paper No. 1 impregnated with Dowex-50 (for details see ref. [1]).

The rhodium perchlorate solution was developed with various concentrations of $HClO_4$. Three spots with intensities similar to those obtained in paper electrophoresis were found in this case also. The major portion, which is the fastest in electrophoresis, is held strongly at the point of application and does not move at all. The other two bands move with different speeds in different concentrations of $HClO_4$. Comparison of the R_F values with those of other ions shows that bands 1 and 2 carry one and two positive charges, respectively, and have presumably two and one chloro-groups co-ordinated to the Rh(III). The third band which appears to carry three positive charges is most likely $Rh(H_2O)_6^{+++}$.

(vii) Removal of Cl by repeated precipitation as $Rh(OH)_3$ and dissolution in $HClO_4$

It appeared to us from the above results that it might be possible to remove the co-ordinated Cl by repeated precipitation of $Rh(OH)_3$ and redissolution in $HClO_4$.

One sample was therefore reprecipitated six times and submitted to paper electrophoresis. Only one band of rhodium could be detected and this had the same speed as the fastest band of the original solution.

References p. 460.

(viii) Comparison of the speed of Rh(III) with other trivalent ions

The rhodium(III) perchlorate solution obtained according to (vii), and Fe^{+++} perchlorate were electrophorized side by side on the same paper strip. Both were found to have moved about the same distance, the Rh(III) lagging a little behing the Fe^{+++}.

(ix) Ion exchange studies with Rh(III) perchlorate prepared according to (vii)

On Dowex-50 paper the Rh(III) solution prepared according to (vii) gave only one strongly adsorbed band at the point of application, confirming the conclusion of (vi).

(x) Electrophoretic behaviour of Rh(III), prepared according to (vii), with varying electrolyte concentration

The solution obtained according to (vii) gave only one band with all concentrations of $HClO_4$ in the range 0.25–1.5 *N*. With lower concentrations the band was much diffused.

CONCLUSION

Our results indicate that "rhodium hydroxide" when precipitated from $RhCl_5^{--}$ solutions contains appreciable amounts of co-ordinated chloro-groups. The complexity of the products obtained when $Rh(OH)_3$ is treated with H_2SO_4 or HNO_3 may be partly due to the formation of mixed chloro-sulphato or chloro-nitrato complexes. Although heating with $AgNO_3$ or reprecipitation may remove the chloro-groups, only the first of the two methods shows any promise of an analytical application since with each precipitation considerable losses are incurred.

We have also shown how a solution of $Rh(H_2O)_6(ClO_4)_3$ may be prepared.

SUMMARY

The action of $HClO_4$ on rhodium hydroxide was studied with paper electrophoresis and ion exchange chromatography. The existence of chloro-complexes due to precipitation of co-ordinated Cl in the preparation of $Rh(OH)_3$, was demonstrated. These can be decomposed by repeated precipitation or heating with $AgNO_3$.

REFERENCES

1 M. LEDERER, *Paper presented to the Congress on Analytical Chemistry*, Moscow, December 1957.
2 M. LEDERER, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 279.
3 M. LEDERER AND F. L. WARD, *Anal. Chim. Acta*, 6 (1952) 355.

Received March 21st, 1958

QUALITATIVE, QUANTITATIVE AND PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY OF STEROIDS ON FULLY ACETYLATED PAPER*

I. QUALITATIVE CHROMATOGRAPHY OF Δ^4- AND $\Delta^{1,4}$-3-KETOSTEROIDS

F. J. RITTER AND J. HARTEL

Central Laboratory T.N.O., Delft (The Netherlands)

INTRODUCTION

During the last decade many methods have been developed for the paper-chromatographic separation of steroids[1]. In most of them use is made of a relatively polar, non-volatile stationary phase, such as propyleneglycol[2], phenylcellosolve[3] or formamide[2] and a nonpolar mobile phase, such as toluene, benzene or heptane. Some reversed phase techniques have also been applied, in which the paper is rendered hydrophobic with, *e.g.*, stearato-chromylchloride (Quilon)[4], paraffin oil[5,6], kerosene[7] or silicone[8] and the mobile phase is a relatively polar liquid, such as glacial acetic acid, an alcohol, or an alcohol–water mixture.

In all these cases the paper has to be impregnated with the stationary phase. This has the following disadvantages:

1. Humidity[3] and temperature[7b] of the air, time and temperature of application of the substances[9], the way of blotting or drying the papers after the impregnation and other factors affect the amount and condition of the impregnating substance on the paper.

Moreover, the spots of the substances to be chromatographed must be applied after the impregnation and local displacement of the stationary phase by the solvent used for these substances may result[7b].

As a consequence of all these factors the reproducibility of the results in general and the R_F values in particular, is usually rather bad.

2. A non-volatile impregnating substance may interfere in quantitative determinations.

3. In reversed phase chromatography the influence of the polar OH groups cannot be completely eliminated by impregnation with a hydrophobic solvent. These groups may cause undesirable adsorption effects, for example incomplete elution in quantitative determinations.

---

* Some preliminary data were presented to the International Congress on Clinical Chemistry at Stockholm, August 1957, in a paper by Dr. F. J. Ritter.

A short communication on the same subject has appeared as a "Letter to the Editor" in *Nature*, 181 (1958) 765.

References p. 470.

Reversed phase chromatography has also been applied on acetylated paper, in which case impregnation with a nonpolar liquid is not necessary as the acetylation renders the paper hydrophobic. The separation of various lipophilic substances on *partially* acetylated papers has been described by several authors[10,11,12]. It is, however, difficult to obtain a homogeneous partially acetylated paper with a constant degree of esterification. A commercially available partially acetylated paper (*e.g.*, Schleicher and Schüll 2043b "acetyliert") has been found to be very heterogeneous. The saponification number varied not only for different sheets, but also within one paper as much as from 200 to 300 mg of KOH per gramme[13] and, consequently, the R_F values obtained with it are not reproducible.

For investigations carried out in this laboratory, in which large numbers of chromatograms had to be compared as a part of a screening programme, well-reproducible R_F values were desired. We therefore developed methods for the separation of steroids on fully acetylated paper, prepared by the method of ZIJP[14]. This paper is very homogeneous and has a saponification number of at least 570 (calculated for cellulose triacetate: 583). ZIJP used this paper for the identification and quantitative determination of antioxidants in rubber[15].

For the separation of steroids special phase systems and solvent mixtures had to be worked out. Three different types of chromatography were developed, *viz.* reversed phase "adsorption" chromatography with a one-phase mixture, reversed phase partition chromatography with a two-phase mixture and "conventional" partition chromatography with a two-phase mixture of benzene, methanol and water. Good separations of various groups of steroids have been obtained by these methods.

This paper describes the qualitative chromatography of Δ^4- and $\Delta^{1,4}$-3-keto-steroids on fully acetylated paper. The chromatography of other steroids, the quantitative and the preparative chromatography of steroids on fully acetylated paper will be described in subsequent papers.

PHASE SYSTEMS AND TYPES OF CHROMATOGRAPHY

Method A. Reversed phase "adsorption" chromatography with a one-phase mixture of benzene, methanol and water

In the first experiments a one-phase mixture of benzene, methanol and water, 1:10:3, was used as the mobile phase. No accommodation was applied, as equilibration with the mobile phase yielded less regular spots. The method should perhaps be regarded as adsorption chromatography rather than as partition chromatography. Well-reproducible R_F values are obtained with it, but some tailing is usually observed (Fig. 1). The chromatograms show a reversed phase pattern, *i.e.* the more polar steroids have higher R_F values than the less polar ones, as is usual for chromatography on acetylated paper.

Method B. Reversed phase partition chromatography with a two-phase mixture of benzene, methanol and water

To prevent the tailing effects, efforts were made to find a method by which accommo-

References p. 470.

dation of the paper could be performed, without losing the separating capacities of the system.

This proved to be possible when the ratio of benzene, methanol and water is chosen in such a manner that two phases are obtained. One phase is then used for the equilibration, by hanging the paper in its vapours, and the other is used as the mobile phase.

As the solvent moves very fast over the paper, especially during the first few

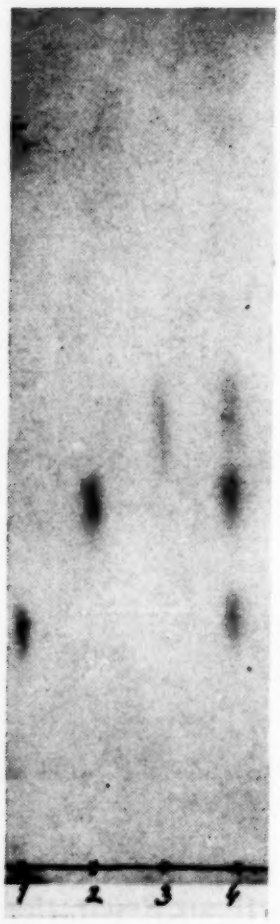


Fig. 1

Fig. 2

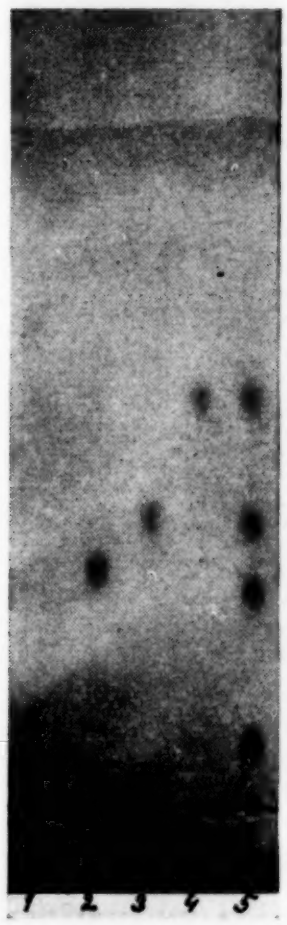


Fig. 3a

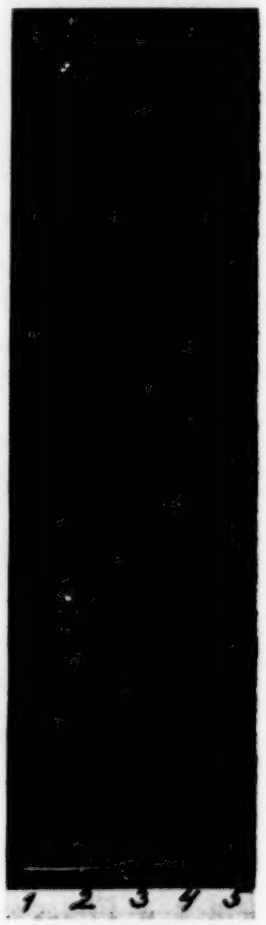


Fig 3b

Fig. 1. Phase system A. Detection with DNPH reagent. 1 = cholestenone; 2 = progesterone; 3 = cortisone; 4 = mixture. 40 γ spots.

Fig. 2. Phase system B. Detection with DNPH reagent. Separation of some corticosteroid (C_{21}) acetates. 1 = 11-deoxycorticosterone acetate; 2 = cortisone acetate; 3 = hydrocortisone acetate; 4 = mixture. 60 γ spots.

Fig. 3. Phase system B. a. Detection with DNPH reagent. b. Detection: fluorescence reaction of BUSH. Separation of C_{19} steroids (acetate) and cholestenone (C_{27}). 1 = cholestenone; 2 = testosterone acetate; 3 = Δ^4-androstene-3,17-dione; 4 = testosterone; 5 = mixture. 40 γ spots.

minutes, it may be convenient to sew a "retardation strip" of unacetylated paper along the edge of the acetylated paper. This is most clearly demonstrated in Figs. 2 and 3a*. In this way more compact and regular spots are obtained.

Successful separations have been obtained with the two-phase mixture benzene–methanol–water 4:4:1. When the lower layer (mainly benzene) is used for the accommodation and the upper layer (mainly methanol) as the mobile phase, reversed phase chromatograms are obtained. Just as in method A, the more polar steroids have higher R_F values than the less polar ones (Figs. 2, 3a, 3b and 4a).

---

* In Figs. 3b, 4a and 4b retardation strips are also present, but they are less clearly visible on the photograph.

References p. 470.

Method C. "Conventional" partition chromatography with a two-phase mixture of benzene, methanol and water

It is also possible to use the upper (more polar) layer of the mixture benzene–methanol–water 4:4:1 for accommodation and the lower layer as the mobile phase. In that case chromatograms are obtained, in which the weakly polar steroids have higher R_F

Fig. 4a

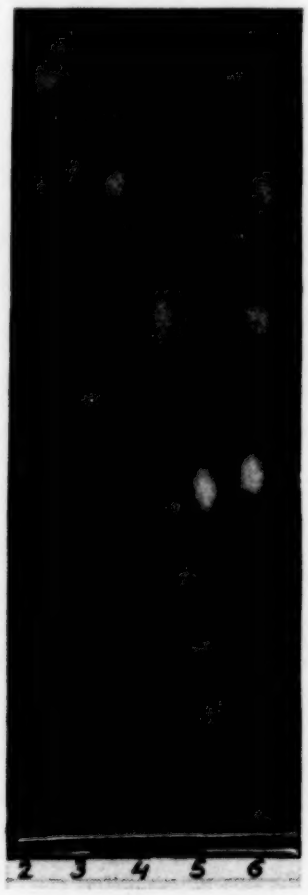


Fig. 4b

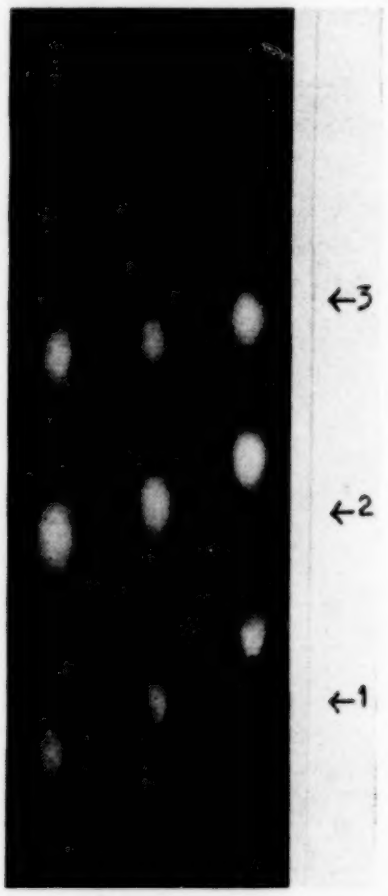


Fig. 5

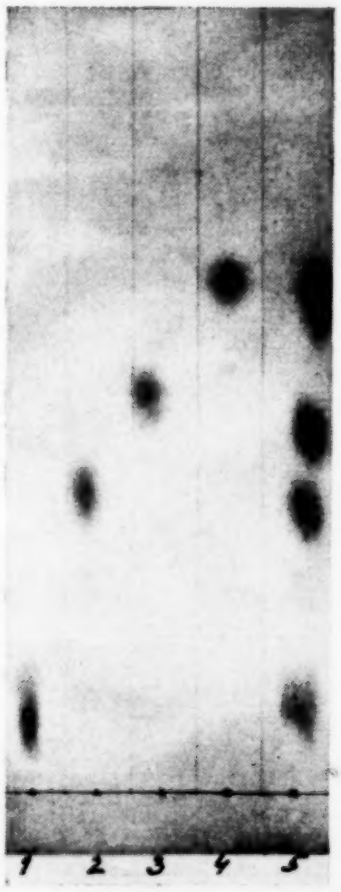


Fig. 6

Fig. 4. a. Phase system B. b. Phase system C. Detection: fluorescence reaction of BUSH. Separation of some C_{21} steroids and cholestenone. 1 = cholestenone; 2 = progesterone; 3 = 17*a*-hydroxyprogesterone (progesterone + 1 OH); 4 = Reichstein's Substance S (progesterone + 2 OH); 5 = hydrocortisone (progesterone + 3 OH); 6 = mixture. 40 γ spots.

Fig. 5. Phase system B, without retardation strip. Influence of distance from edge to starting-points, on size and form of spots. Detection: fluorescence reaction of BUSH. Mixtures of cholestenone (1), progesterone (2) and testosterone (3). 40 γ spots.

Fig. 6. Phase system B, without retardation strip. Detection with DNPH reagent. 1 = cholestenone; 2 = testosterone acetate; 3 = Δ^4-androstene-3,17-dione; 4 = testosterone; 5 = mixture. 80 γ spots.

values than the more strongly polar ones. As this type of chromatogram was the normal one in the early days of chromatography, it is often referred to as being "conventional". It should, however, be noted that in the case of chromatography on acetylated paper it is in fact rather unusual (Fig. 4b, *cf.* Fig. 4a).

Whereas in method A the chromatography takes only 5 hours, methods B and C require 16 hours for accommodation, followed by 8 hours for chromatography, if in all cases the ascending technique is used. In methods B and C, however, tailing of the spots is largely prevented, the separations are better and the spots more compact. In methods B and C a prolongation of the time of equilibration has no harmful effects and these methods may, in contrast to method A, be regarded as partition chromatography rather than as adsorption chromatography.

References p. 470.

A wide range of steroids, from weakly polar (Δ^4-cholesten-3-one) to strongly polar (hydrocortisone), may be chromatographed by methods A and B. With method C strongly polar steroids are better separated, but steroids less polar than progesterone move with the front.

A similar improvement to that obtained by using a retardation strip can be achieved by choosing the starting-line at a greater distance from the lower edge of the acetylated paper. If a distance of 9 cm is chosen, rather compact spots may also be obtained. The R_F values in this case are not very different from those which are obtained if a retardation strip of unacetylated paper is used (Fig. 5).

However, without any retardation, fairly good chromatograms are sometimes obtained with the phase system of method B (Fig. 6).

In all the methods mentioned so far, the ascending technique was applied. Descending chromatography may also be carried out, if the differences in R_F values between the components of a mixture are not sufficient. The mobile phase may then be allowed to drip off the paper or, more conveniently, be absorbed in a roll of paper, attached to the lower edge of the acetylated paper. The resolution may often be enhanced in this way, but no R_F values can be determined and the reproducibility is inferior to that obtained with the ascending technique.

RESULTS

A great variety of steroids has been chromatographed by the methods mentioned. The phase systems have been summarized in Table I and the R_F values of a number of Δ^4- and $\Delta^{1,4}$-3-ketosteroids are summarized in Table II.

From Table II and the figures it will be seen that satisfactory separations of various groups of steroids have been obtained.

The methods may be used for the separation of sex hormones, adrenal cortex hormones and their acetates, and also for weakly polar steroids such as testosterone acetate and cholestenone.

By similar methods other steroids, such as cholesterol and its oxidation products, bile acids, androsterone, etc., may be separated, as will be described in a later paper.

As the figures show, very regular and compact spots are obtained, especially

TABLE I

PHASE SYSTEMS AND TYPES OF CHROMATOGRAPHY

Ratio C_6H_6:CH_3OH:H_2O	*Stationary phase*	*Mobile phase*	*Type*
A. 1:10:3 (one phase)	acetylated paper	total solvent mixture	adsorption (?), reversed phase
B. 4:4:1 (two phases)	acetylated paper, accommodated with lower layer	upper (most polar) layer	partition, reversed phase
C. 4:4:1 (two phases)	acetylated paper, accommodated with upper layer	lower layer	partition, conventional

References p. 470.

TABLE II

MEAN R_F VALUES OF Δ^4- AND $\Delta^{1,4}$-3-KETOSTEROIDS AFTER CHROMATOGRAPHY ON FULLY ACETYLATED PAPER

Steroid	*Methods used Phase system (see Table I)*		
	A	*B*	*C*
C_{27} steroid			
Δ^4-Cholesten-3-one	0.28	0.09	—
C_{21} steroids			
Progesterone	0.48	0.35	0.88
11-Deoxycorticosterone	0.54	0.45	0.77
17*a*-Hydroxyprogesterone	0.54	0.47	0.75
Reichstein's Substance S	—	0.57	0.57
Cortisone	0.61	0.60	0.43
Hydrocortisone	0.68	0.68	0.36
Prednisone	—	0.65	—
Prednisolone	—	0.73	—
17*a*-Ethynyltestosterone	—	0 45	—
C_{21} steroid acetates			
11-Deoxycorticosterone acetate	—	0.30	—
Cortisone acetate	—	0.46	—
Hydrocortisone acetate	—	0.56	—
C_{20} steroid			
17-Methyltestosterone	—	0.51	—
C_{19} steroids			
Δ^4-Androstene-3,17-dione	0.52	0.41	—
$\Delta^{1,4}$-Androstadiene-3,17-dione	—	0.47	—
Δ^4-Androsten-17*a*-ol-3-one	—	0.52	—
Testosterone	0.60	0.57	—
C_{19} steroid acetate			
Testosterone acetate	0.27	0.32	—
C_{18} steroid			
19-Nortestosterone	—	0.55	—

with methods B and C. A fine example of the influence of the introduction of 1, 2 and 3 OH groups into the progesterone molecule is found in Figs. 4a and 4b. In method B, the R_F value is approximately proportional to the number of OH groups. As the table shows, the increase in the R_F value on the introduction of each OH group is 0.10–0.12. In method C the corresponding decrease is larger (0.11–0.21), but not constant. In that case the separations are the better, the more polar the steroids.

EXPERIMENTAL

Apparatus

The chromatography was usually carried out in cylinders, which had the following dimensions: height 50 cm, internal diameter 19 cm*. For the ascending technique, which was usually applied, two troughs with a capacity of 50 ml each, were placed

* If other cylinders or cabinets are used, the amount of solvents should be changed in proportion to the internal volume of the vessel.

References p. 470.

at the bottom. The cover of the cylinder had one centric and one excentric hole, which could be closed with corks. The cork in the centric hole carried an all-glass paper-hanger provided with hooks, which could carry two parallel sheets of paper. The cylinders were placed in a conditioned room at 25°.

Two ultra-violet light sources were used for the detection of the spots, namely a Hanovia Chromatolite* and a Chromatolux**.

Acetylated papers

Generally Whatman paper No. 1 was used and acetylated by the method of ZIJP[14], with only minor modifications:

16 sheets of paper of 46.7 × 14 cm each (the longer side perpendicular to the machine direction of the paper), in total about 90 g, are loosely rolled together and placed in a cylindrical vessel of about 2 l. The papers are covered with glacial acetic acid and after 16 hours the acid is decanted. An acetylating mixture containing 440 ml acetic anhydride, 545 ml glacial acetic acid, 1250 ml toluene and 1.25 ml 60% perchloric acid, and cooled to about 10°, is poured into the vessel until the papers are entirely covered by the mixture. The vessel is cooled in an ice-bath and the contents are gently agitated by occasional stirring. The temperature should not rise above 20°. The next day the mixture is poured off and the vessel is put upside down on a Büchner funnel to drain the papers. One by one the papers are then removed cautiously and blotted between ordinary filter paper. Thereupon they are washed 3–4 h in running water and subsequently dried, first at room temperature and then in a drying oven during 10 min at 100°.

After the acetylation the papers are about 44 × 13 cm and have become about three times as thick.

For methods B and C a retardation strip of Whatman paper No. 4 of 3 × 13 cm (shorter side perpendicular to the machine direction of the paper) is sewn to the end of the acetylated paper by means of a sewing machine, with an overlap of 1 cm.

Some experiments have also been made with Schleicher and Schüll paper 2043a "vollacetyliert", which has recently become commercially available. The results obtained were slightly different from those described in this paper. For qualitative experiments we prefer the papers prepared in this laboratory, with which somewhat more compact spots were obtained. For preparative purposes, especially in the "chromatopile", the S & S paper has some definite advantages, as will be described in a subsequent paper.

Partially acetylated S & S paper has also been tested. Compact spots were obtained, but apart from the inferior homogeneity, it turned out to have the disadvantage of giving less satisfactory separations and, moreover, the detection method of BUSH was less sensitive on this paper, possibly as a result of the stronger fluorescence of the background.

* Hanovia Ltd., Slough, England.
** Gerard Pleuger N.V., Rotterdam, The Netherlands.

References p. 470.

Reagents

a. Distilled benzene.
b. Distilled methanol.
c. Distilled water.
d. Alcoholic DNPH reagent: 0.15 g 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) is dissolved in 25 ml concentrated hydrochloric acid and subsequently adjusted to 100 ml with distilled water. Before use the solution is mixed with an equal volume of 96% ethanol.
e. Reagent of BUSH: 10 g of NaOH is dissolved in 100 ml 60% aqueous methanol.

Chromatographic procedures

Usually two sheets of fully acetylated paper of about 44 × 13 cm are run together in one cylinder. The spots of the steroids or mixtures are preferably applied in a 1% methanol or ether solution. It should be noted that the paper is soluble in acetone and chloroform. The spots may contain up to 150 μg of each of the individual steroids. In methods B and C larger quantities may be applied but then some "tailing" will result. The papers are attached to the hanger in such a way, that they dip about 3 mm into the solvent. After chromatography the papers are dried in a drying oven for 15 min at 60°, before the detection is carried out.

Method A. The spots are applied at 3 cm from the lower edge of the paper. The two troughs are filled with 35 ml each, of a mixture of benzene, methanol and water, 1:10:3. The papers are attached and the solvent is allowed to ascend for about 5 hours. The front is then about 36 cm from the starting line.

Method B. A mixture of benzene, methanol and water, 4:4:1 is shaken in a separating funnel. On standing two phases separate. The sheets of acetylated paper (44 × 13 cm) are provided with a retardation strip, as described before, and the spots are applied at 3 cm from the lower edge of the acetylated paper, *i.e.* 5 cm from the lower edge of the retardation strip. The papers are attached to the hanger and 120 ml of the lower layer of the solvent mixture is poured on the bottom of the cylinder. The papers are accommodated for 16 hours and subsequently 35 ml of the upper layer is poured into each of the two troughs, through the excentric hole in the cover, by means of a long pipette. The mobile phase is allowed to ascend for 8 hours. The front is then about 32 cm from the starting line.

Method C. This method is carried out in the same way as method B, but now the upper layer of the solvent mixture is used for accommodation and the lower layer as the mobile phase.

Detection

Method 1. The detection of Δ^4-3-ketosteroids on the chromatogram is most easily performed by examination of the dry chromatogram in ultra-violet light of a sufficiently low wave length, such as that obtained with the Hanovia Chromatolite (253.7 mμ). The steroids then appear as dark spots on a purple background. In contrast to the

References p. 470.

method mentioned hereafter, $\Delta^{1,4}$-3-ketosteroids and other substances with conjugated systems are also detected by this method.

Method 2. Far more sensitive and more specific than method 1 is the fluorescence method of BUSH[16]. It seems to be quite specific for Δ^4-3-ketosteroids, of which 0.25–2 μg may be detected after development of the chromatogram*. The papers are sprayed with the reagent of BUSH and are subsequently dried for about 10 min at 80° until the paper turns slightly yellow. The chromatograms are then observed in the ultra-violet light of the Chromatolux (maximum at 360 mμ). The Δ^4-3-ketosteroids appear as yellow to orange spots on a purple background. No reaction is obtained with $\Delta^{1,4}$-3-ketosteroids.

Method 3. The detection of Δ^4-3-ketosteroids may also be carried out with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). This reagent should be applied in alcoholic solution, as an aqueous solution does not wet the hydrophobic acetylated paper. Unconjugated ketosteroids, such as androsterone, are not detected by this method, probably because the paper is also coloured by the reagent. The Δ^4-3-ketosteroids, however, appear as orange spots on a yellow background.

$\Delta^{1,4}$-3-Ketosteroids also give orange spots, but they react more slowly with DNPH and the spots are sometimes rather faint.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their sincere thanks to Dr. G. J. SCHURINGA for his encouragement and to Miss P. VAN DE RIVIÈRE, Miss C. HOUWING and Miss A. BOL RAAP for technical assistance. Thanks are also due to Dr. J. W. H. ZIJP for valuable discussions, and to N.V. Organon, Oss, Merck Sharp & Dohme Nederland N.V., Haarlem, and N.V. Van Schuppen & Zoon, Veenendaal, for generous gifts of steroids.

SUMMARY

A wide range of Δ^1- and $\Delta^{1,4}$-3-ketosteroids, from weakly polar to strongly polar, may be chromatographed and detected on cellulose triacetate paper, with benzene–methanol–water mixtures as developing solvents. Three systems have been worked out. In the first a one-phase mixture of benzene, methanol and water is used as the mobile phase and the paper is not accommodated. A "reversed phase" type of chromatogram is obtained, *i.e.* the more polar compounds have higher R_F values than the less polar ones, as is usual for chromatography on acetylated paper. If, however, two-phase mixtures of benzene, methanol and water are used, as was the case in the other two methods, "reversed phase" as well as "conventional" type chromatograms may be obtained. This depends upon whether the lower or the upper layer is used as the mobile phase, the other layer being used for accommodation of the paper. Perhaps the first-mentioned method should, in contrast to the other two, be regarded as adsorption chromatography, rather than as partition chromatography.

Well-reproducible R_F values are obtained and, especially with the two-phase mixtures, compact spots are found. Detection methods and R_F data are given for various Δ^1- and $\Delta^{1,4}$-3-ketosteroids, ranging from C_{18} to C_{27} compounds and including sex hormones and adrenocortical hormones.

* The sensitivity may be further enhanced by cooling. In a recent article[17], attention was drawn to the fact that many substances which show no fluorescence at room temperature, do so on cooling. We found that the sensitivity of the method of BUSH is improved by dipping the chromatogram in liquid nitrogen. The spots then become brighter and show an afterglow. The colour shifts in the direction from orange → yellow → green.

References p. 470.

REFERENCES

1 a. E. HEFTMANN, *Chem. Revs.*, 55 (1955) 679.
b. E. LEDERER AND M. LEDERER, *Chromatography, A Review of Principles and Applications*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1957, p. 278.
C. R. NEHER, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 205.
2 A. ZAFFARONI, R. B. BURTON AND E. H. KEUTMANN, *Science*, 111 (1950) 6.
3 R. NEHER AND A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 276.
4 a. D. KRITCHEVSKY AND M. CALVIN, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 4330.
b. D. KRITCHEVSKY AND M. R. KIRK, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4484.
5 E. KODICEK AND D. R. ASHBY, *Biochem. J.*, 57 (1954) xii.
6 C. MICHALEC, *Naturwiss.*, 42 (1955) 509.
7 a. R. P. MARTIN AND I. E. BUSH, *Federation Proc.*, 14 (1955) 252.
b. R. P. MARTIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 408.
8 T. H. KRITCHEVSKY AND A. TISELIUS, *Science*, 114 (1951) 299.
9 F. J. LOOMEYER AND G. M. LUINGE, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 179.
10 J. V. KOSTIR AND K. SLAVIK, *Collection Czechoslov. Chem. Communs.*, 15 (1950) 17.
11 F. MICHEEL AND P. ALBERS, *Chem. Ber.*, 89 (1956) 140.
12 H. S. BURTON, *Chem. and Ind. (London)*, 72 (1953) 1229.
13 J. W. H. ZIJP, *Rec. trav. chim.*, 75 (1956) 1129.
14 J. W. H. ZIJP,, *Chem. Weekblad*, 51 (1955) 547.
15 J. W. H. ZIJP, *Rec. trav. chim.*, 76 (1957) 313.
16 I. E. BUSH, *Biochem. J.*, 50 (1952) 372.
17 A. SZENT-GYÖRGYI, *Science*, 126 (1957) 751.

Received March 20th, 1958

SHORT COMMUNICATION

Mess-Einrichtung für Radio-Chromatogramme und -Pherogramme

Die Kombination von Papier-Chromatographie und Isotopen-Technik findet eine immer weitere Verbreitung (vgl. SANWAL[1]). Um eine radioaktive markierte Substanz in einem biologischen Gemisch identifizieren zu können, bedient man sich entweder der Autoradiographie oder der Zählrohr-Technik. Die letztere erfreut sich besonderer Beliebtheit, weil sie leicht quantitativ ausgebaut werden kann.

Für die Ausmessung von Papier-Chromatogrammen und -Pherogrammen hat sich in Verbindung mit dem Universal-Bleiturm von Philips die nachstehend beschriebene Apparatur besonders bewährt. Der Philips-Bleiturm (PW 4122/23/24) besteht aus einem Probenhalter, einem Satz Bleiringe und einem Bleideckel zum Abschirmen eines Geiger-Müller-Zählrohres. Die Dimen-

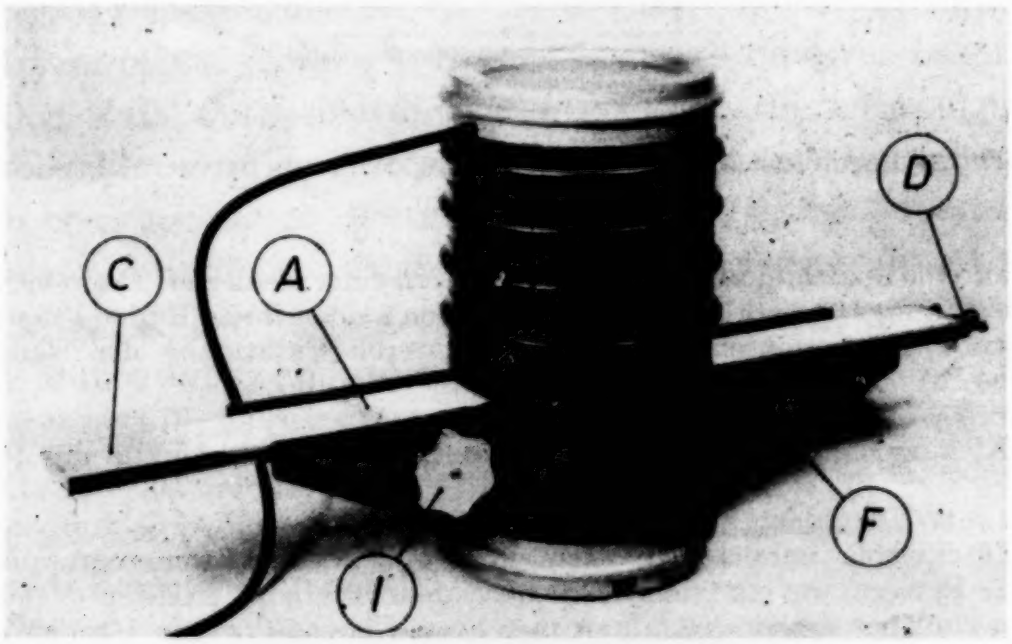


Fig. 1. Philips-Universal-Bleiturm mit eingebauter Messbank zum Ausmessen von Radio-Chromatogrammen und -Pherogrammen.

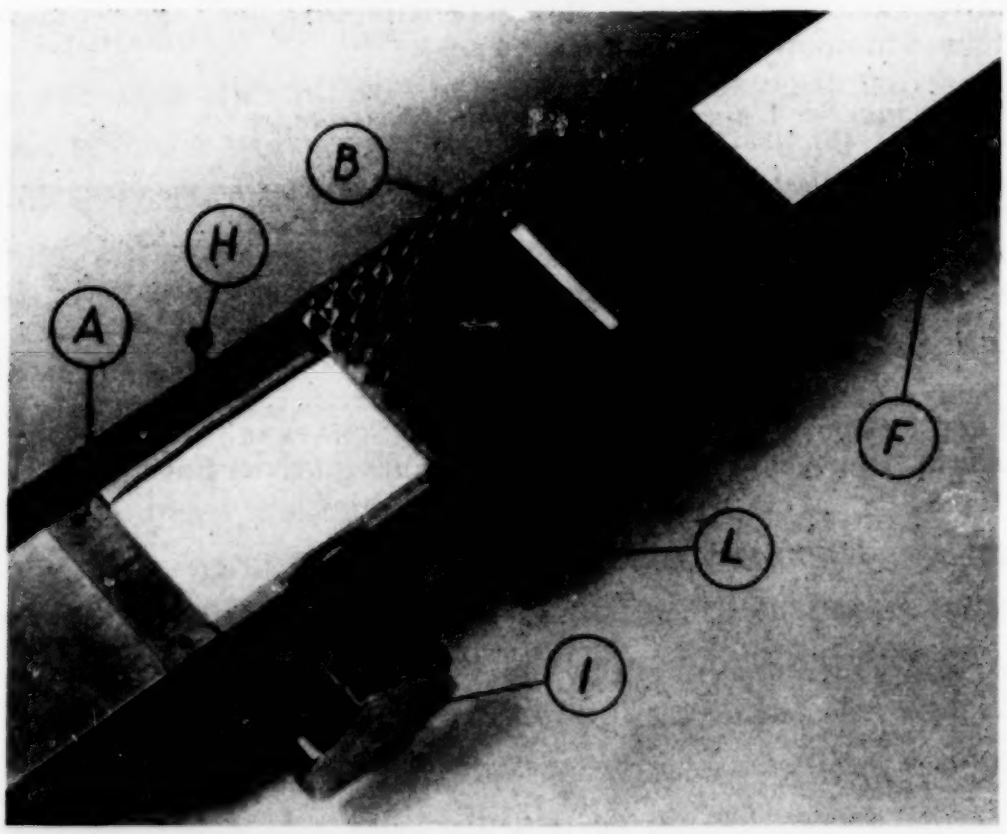


Fig. 2. Mittelteil der Messbank vor dem Einbau in den Bleiturm, von oben gesehen.

sionen sind so gewählt, dass Sonden verschiedener Dimension und auch Szintillationszähler eingesetzt werden können. In den Probenhalter ist ein Plexiglasrahmen eingebaut, der mit Hilfe von Schiebern die Zufuhr der zu messenden Proben vor das Endfenster gestattet.

Der Philips-Bleiturm lässt sich seiner universellen Bestimmung gemäss für das Ausmessen von Papierstreifen umbauen: Nach Losmachen der beiden Bodenschrauben kann der Plexiglas-Rahmen entfernt werden. In die frei werdende Öffnung wird eine verstellbare Messbank eingepasst (Fig. 1, 2), auf welche mit zwei Klemmen die Papierstreifen befestigt werden können. Die Einrichtung wird mit zwei Schrauben (G) im Probenhalter fixiert. Mit Hilfe eines Handrades (I) kann der Papierträger (C) unter der eingebauten Spaltblende (B) durch eine Zahnstange (J) jeweils um 5 mm verschoben werden. Ein Zeiger (L) gestattet das Ablesen des Vorschubs.

Die in Fig. 3 im Schnitt dargestellte Messeinrichtung* gestattet das Ausmessen von Papierstreifen bei stets gleichbleibender Geometrie. Entsprechend der Breite des Streifens und der Art

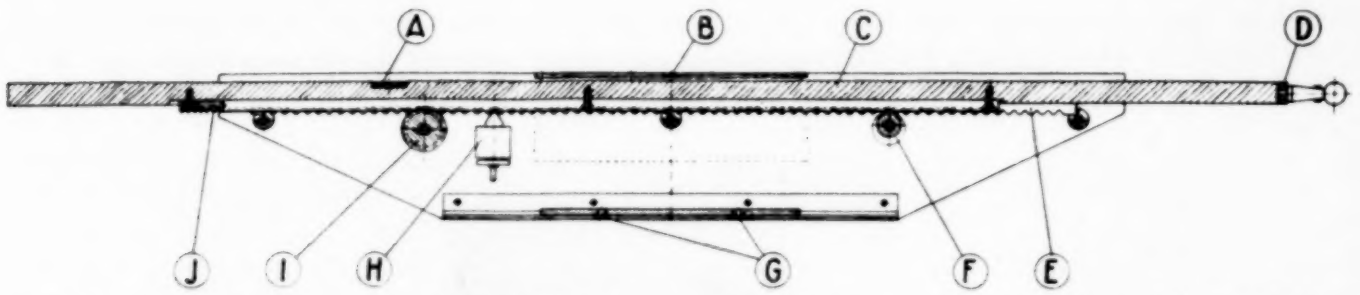


Fig. 3. Längsschnitt durch die Messeinrichtung; der Bleiturm ist der Übersichtlichkeit halber weggelassen.

des Strahlers kann die Spaltöffnung (B) durch Einsetzen einer Maske auf 2 mm verkleinert werden. Durch die Papierspanner (A und D) werden die Streifen an den freien Enden gehalten. Der Papierspanner A kann bei ausgefahrenem Papierträger durch Betätigung der Rändelschranke des Exzenterknopfes (F) betätigt werden.

Die Sperre (H) auf der Zahnstange für die 5 mm-Arretierung (E) lässt sich durch Umlegen eines Hebels (K) ausschalten, sodass dann ein kontinuierlicher Vorschub des Papierträgers (C) möglich ist.

Pherogrammstreifen der Grassmann- oder LKB-Produkter-Apparaturen lassen sich auf Grund ihres Zuschnittes unmittelbar ausmessen. Als Radio-Chromatogrammen eignen sich besonders solche Papiere, die eindimensional nach dem Streifen-Verfahren[2,3] gewonnen wurden. Die Substanzen sind bei diesem Verfahren in schwach bogenförmigen Banden scharf getrennt. Auch zweidimensionale Chromatogramme können ausgemessen werden; sie müssen jedoch vorher in 2–4 cm breite Streifen zerschnitten werden.

Die Impulse pro Flächengrösse des Maskenfensters werden in Abhängigkeit von der Entfernung vom Startpunkt aufgetragen; die Maxima entsprechen der Lage der markierten Komponenten, die auf dem Chromatogramm vorhanden sind.

Botanisches Laboratorium der Universität, Nijmegen (Niederlande) H. F. LINSKENS

[1] B. D. SANWAL, *Isotopentechnik*, in H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, Springer Verl., Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, S. 30–42
[2] W. MATTHIAS, *Naturwiss.*, 41 (1954) 17; *Züchter*, 24 (1954) 313.
[3] H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, Springer Verl., Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, S. 3.

Eingegangen den 1. April 1958

* Ich danke den Herren K. A. PETERS und R. J. C. SCHAPERS (Feinmechanische Werkstätten der R.K. Universität Nijmegen) für die Hilfe bei der konstruktiven Entwicklung und Ausführung.

RECEIVED
JAN 21959
ESSO TECHNICAL
LIBRARY

REVIEW

THE CHROMATOGRAPHIC IDENTIFICATION OF ANTHOCYANIN PIGMENTS

J. B. HARBORNE

John Innes Horticultural Institution, Hertford (Great Britain)

INTRODUCTION

Chromatography is well recognised to-day as an indispensable technique in the study of all kinds of plant pigments. Only in the last ten years, however, has it been applied to the separation of the water-soluble pigments, such as the anthocyanins. Attempts to separate them by absorption chromatography on columns, a technique which had so successfully been applied to the carotenoid pigments[1], did not meet with much success[2,3]. It was not until the introduction of paper partition chromatography into this field by BATE-SMITH in 1948[4,5] that satisfactory chromatographic methods for separating the anthocyanins and related flavonoid pigments became available. Since then, paper chromatography has been used in the identification of individual pigments, especially the minor components, in complex mixtures of flavonoid compounds, such as are found in the flowers of *Antirrhinum majus*[6], *Dahlia variabilis*[7] and in many other plant extracts. As a result of these and other investigations (*e.g.*[8]) the R_F values of all the main classes of flavonoid compounds, including the anthocyanins, became available and some general reviews of these data have already appeared[9–11].

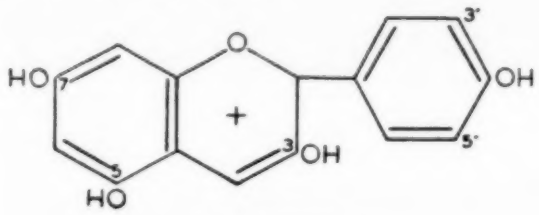
This review is concerned only with the chromatography of the anthocyanins, the compounds responsible for most of the red, purple and blue pigmentation in plants[12]. They are more difficult to characterise by conventional methods than the related flavones and the well known colour and distribution tests[13] are limited in their scope. For these reasons, chromatographic methods are of especial importance for characterising anthocyanins. Their value may be illustrated by the fact that the recent discoveries in plants of two new anthocyanin aglycones, *i.e.* anthocyanidins[14,15], and several new classes of anthocyanin[16,17] were only made possible by means of paper chromatography. It has also been shown in this laboratory[17,18] and elsewhere[19,20] that unknown pigments can be quickly and economically identified on a micro-scale by the aid of chromatographic techniques.

The paper chromatography of the anthocyanins will first be reviewed and some previously unpublished R_F values will be given and discussed. A description of the value and limitations of the chromatographic approach to anthocyanin identification will form the main part of this article. Finally, some examples will be given of the use that has already been made of chromatographic methods in studying the occurrence and distribution of anthocyanins in plants.

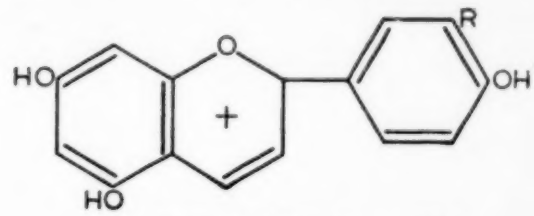
Before closing this introduction, it is necessary to consider what is involved in

References p. 487/488.

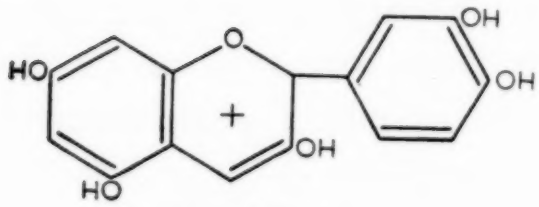
characterising anthocyanins. The main facts of their chemistry are now well established (for review, see, *e.g.* WAWZONEK[21]). They occur in nature in combination with sugars (as glycosides) and occasionally also in association with organic acids (as acylated or "complex" glycosides). There are only a few different anthocyanidins formed on acid hydrolysis of anthocyanins and all have the same basic chemical structure (see Fig. 1). In addition, the positions at which sugars may be attached to



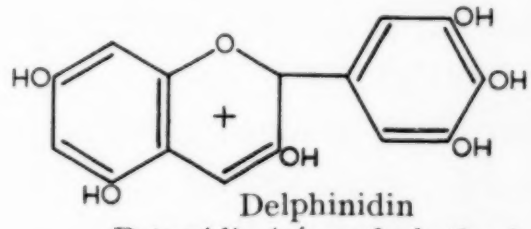
Pelargonidin



Apigeninidin (R = H)
Luteolinidin (R = OH)



Cyanidin
Peonidin (3′-methyl ether)
Rosinidin (7,3′-dimethyl ether?)



Delphinidin
Petunidin (3′-methyl ether)
Malvidin (3′, 5′-dimethyl ether)
Hirsutidin (7, 3′,5′-trimethyl ether)

Fig. 1. The naturally occurring anthocyanidins.

hydroxyl groups in the anthocyanin molecule are restricted and residues are only normally found in the 3-position or in the 3- and 5-positions. The characterisation of an unknown pigment thus depends on identifying the anthocyanidin produced on hydrolysis and on determining the nature, position of attachment and number of sugars present. In addition, examination for the presence of an acyl component must be made and if present, the organic acid concerned must be identified.

It will be shown here that chromatography can be used at each step in the identification of anthocyanins. It must however be emphasised that chromatographic methods should be combined with other techniques for the complete structural determination of anthocyanins. For example, spectral methods are important[3,22] and can be used most profitably in conjunction with chromatographic studies. Finally, it must be stressed that considerable experience is necessary for interpreting chromatographic data, which must be related to similar data obtained from reference compounds.

I. PAPER CHROMATOGRAPHY OF ANTHOCYANINS

The use of paper chromatography in the study of anthocyanins is a logical extension of the tests devised by ROBINSON AND ROBINSON[13] for distinguishing different glycosidic classes according to their distribution between water and amyl alcohol. BATE-SMITH[4,5] first showed that anthocyanins could be readily separated on filter paper developed with butyl alcohol–acetic acid–water and he published R_F values for most of the anthocyanins that were known at the time and that had been synthesised in the laboratory. Other workers[9,10,23] have since published R_F values for these and

References p. 487/488.

other anthocyanins and several more solvent systems have been employed. The general conditions for the paper chromatography of the anthocyanins are now well appreciated and are as follows.

Extraction

Extracts of plant organs containing pigment can be examined directly by paper chromatography. The solvents used for extraction are methanol or water containing 1% hydrochloric acid. Methanol is generally to be preferred since the extracts are more easily concentrated prior to their application to paper. This is important when extracts are used of plant organs which contain only small amounts of anthocyanin. Leaf extracts are normally washed with petroleum ether to remove chlorophyll, before being concentrated. The R_F values of anthocyanins, present in crude plant extracts, are not completely reliable since the position and number of the spots may be affected by the presence of other components, especially flavonol glycosides. Therefore, in order to obtain accurate R_F values it is essential to purify anthocyanins in plant extracts either by the more usual methods (*cf.*[21]) or by chromatography on thick Whatman paper (see section 2). Anthocyanins so obtained are best dissolved in 1% methanolic hydrochloric acid before being applied to paper.

Filter paper

Whatman No. 1 paper is commonly employed for the chromatography of anthocyanins. All R_F values quoted in this review were measured on this paper. The corresponding grades used by German and Japanese workers are Schleicher and Schüll 2043b MGL and Toyo No. 50 respectively.

Solvent systems

The solvent systems used are listed in Table I. Because anthocyanins are cations and are only stable at acid pH, chromatography is normally carried out in solvent systems containing acid. If solvents do not contain mineral acid, *e.g.* BAW, it is important

TABLE I

SOLVENT SYSTEMS FOR THE CHROMATOGRAPHY OF ANTHOCYANINS

Abbreviation	*Composition*	*Proportions (v/v)*	*Layer used*
BAW	*n*-butanol–acetic acid–water	4:1:5*	top**
BuHCl	*n*-butanol–2 *N* hydrochloric acid	1:1	top**, ***
—	*m*-cresol–acetic acid–water	50:2:48	top
isoPr.	isopropanol–2 *N* hydrochloric acid	1:1	miscible
PhOH	phenol–water	saturated	bottom
—	acetone–0.1 *N* hydrochloric acid	1:3	miscible
—	ethyl acetate–formic acid–water	8:2:3	top
1% HCl	water–12 *N* hydrochloric acid	97:3	miscible
HAc–HCl	water–acetic acid–12 *N* hydrochloric acid	82:15:3*	miscible
30% HAc	water–acetic acid	70:30*	miscible

* Other proportions of these mixtures can also be used.
** The time of use after mixing is important and affects the R_F value.
*** BuHCl should be left for 24 h before use and the paper must also be equilibrated in a tank containing the lower aqueous phase of BuHCl for 24 h.

References p. 487/488.

that sufficient hydrochloric acid is present in the original extract to keep it in chloride form as it travels down the paper[4]. As will be seen in Table I, the solvent systems are mainly of two types, based either on an alcohol (*e.g.* *n*-butanol) or on water. The relative merits of some of these systems are discussed by ABE AND HAYASHI[23]. The author has found BAW, BuHCl, 1% HCl and HAc–HCl to be a useful selection of solvents, each of which gives consistent results. The only solvent system in which it is essential to equilibrate the paper before development in the aqueous phase, is BuHCl. Special care must also be taken with BAW, since the length of time this solvent mixture is allowed to stand before use can affect the R_F values considerably. For measuring standard R_F values, an *n*-butanol–acetic acid–water mixture which has been aged for three days before use, is recommended[5]. For general use, a fresh mixture of these solvents is quite satisfactory and such mixtures have been used routinely in this laboratory.

Chromatograms are normally developed with these solvents by descent, but it has been claimed[24] that more reliable results are obtained with BAW if it is allowed to ascend the paper. Suitable solvent pairs for two-dimensional paper chromatography are BAW and 15% HAc or BuHCl and 1% HCl. Anthocyanins tend to fade and form large diffuse spots when chromatographed in two directions, so that this method has not been greatly used. Circular paper chromatography has also been used with anthocyanins[25].

Visualisation

Different anthocyanins appear as different coloured spots on chromatograms (see Table II) when seen in daylight and characteristically change colour on fuming the paper with ammonia[4]. Examination under ultra-violet light is also of value, since

TABLE II

R_F VALUES AND COLOURS OF PELARGONIDIN GLYCOSIDES

*Pelargonidin glycoside**	*R_F values in*				*Visible*	*Colours in ultra-violet*
	BAW	*BuHCl*	*1% HCl*	*HAc–HCl*		
3-monoglucoside	0.44	0.38	0.14	0.35	orange-red	dull red
3-monogalactoside	0.39	0.37	0.13	0.33		
3-rhamnoglucoside	0.37	0.30	0.22	0.44		
3-diglucoside I**	0.36	0.26	0.50	0.62	orange-red	dull red
3-diglucoside II***	0.30	0.17	0.21	0.47		
3-triglucoside	0.25	0.10	0.35	0.52	orange-red	dull red
3,5-diglucoside	0.31	0.14	0.23	0.45		
3-rhamnoglucosido-5-glucoside	0.29	0.13	0.40	0.58	orange	fluorescent yellow
3-diglucosido (1)-5-glucoside	0.25	0.10	0.60	0.68		
3-diglucosido (1)-7(or 4′)-glucoside	0.18	0.04	0.73	0.73	orange-yellow	dull orange red

* Sources are given in refs. [17,22].
** Isolated from *Papaver rhoeas*.
*** Isolated from *Primula sinensis*, possibly the 3-gentiobioside.

References p. 487/488.

differences in ability to fluoresce provide a means to their identification[17,23]. Pelargonidin and peonidin 3,5- and 5-glycosides appear as intensely fluorescent yellow and pink spots, while the corresponding 3-glycosides are non-fluorescent. Similar, but less striking, differences have been noted with glycosides of the other anthocyanidins. The colours produced by anthocyanins after chromatograms developed in BAW or 15% HAc have been sprayed with a 5% ethanolic solution of aluminium chloride[26], or 2% aqueous ferric chloride[27] have also been noted. These sprays distinguish derivatives of cyanidin, delphinidin and petunidin (positive colour change) from those of the other anthocyanidins (no colour change).

R_F values

The R_F values of anthocyanins as determined in this laboratory are given in Tables II, III and IV. They have been chosen to illustrate the relationship that exists between chemical structure and R_F value in this series, and at the same time, to provide a useful collection of data for identification purposes. The results obtained

TABLE III

R_F VALUES AND COLOURS OF CYANIDIN AND PEONIDIN GLYCOSIDES

Glycoside	*R_F values in*				*Visible*	*Colours in ultra-violet*
	BAW	*BuHCl*	*1% HCl*	*HAc–HCl*		
Cyanidin:						
3-monoglucoside	0.38	0.25	0.07	0.26	magenta	dull
3-monogalactoside	0.37	0.24	0.07	0.26		magenta
3-rhamnoglucoside	0.37	0.25	0.19	0.43		
3-xyloglucoside	0.36	0.24	0.24	0.51	magenta	dull
3-diglucoside	0.33	0.22	0.34	0.61		magenta
3,5-diglucoside	0.28	0.06	0.16	0.40	magenta	bright
3-rhamnoglucosido-5-glucoside	0.25	0.08	0.36	0.59		red
Peonidin:						
3-monoglucoside	0.41	0.30	0.09	0.33	pink	dull pink
3,5-diglucoside	0.31	0.10	0.17	0.44	pink	fluorescent
3-rhamnoglucosido-5-glucoside	0.29	0.12	0.37	0.60		rose

here are in general agreement with values obtained by other workers[5,23] and include figures for a number of anthocyanins not previously available. No attempt has been made to run all chromatograms under standard conditions, but the results given are strictly comparable and are typical values from a large number of determinations.

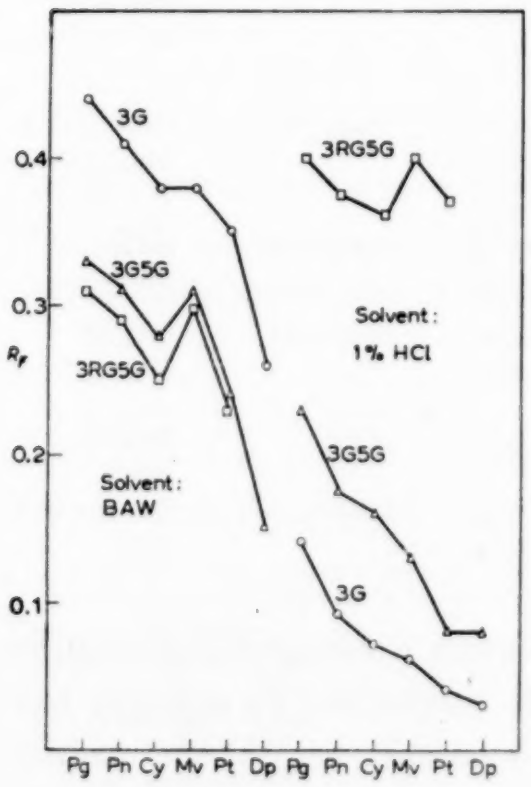
Tables II, III and IV give the R_F values and colours of the most frequent anthocyanins, including the 3-monoglucosides and 3,5-diglucosides of all the common anthocyanidins. Table II, giving the R_F values of ten glycosides of pelargonidin, shows the range of R_F values that can be obtained for a series of different glycosides of the same anthocyanidin. It is also to be noted that no two glycosides have exactly the same R_F values. R_F values in BAW and 1% HCl of three different glycosides of the six main anthocyanidins are plotted graphically in Fig. 2, after the manner of

References p. 487/488.

TABLE IV

R_F VALUES AND COLOURS OF DELPHINIDIN, PETUNIDIN AND MALVIDIN GLYCOSIDES

Glycoside	*R_F values in*				*Visible*	*Colours in ultra-violet*
	BAW	*BuHCl*	*1% HCl*	*HAc–HCl*		
Delphinidin:						
3-monoglucoside	0.26	0.11	0.03	0.18	purple	dull purple
3-rhamnoglucoside	0.30	0.15	0.11	0.37	purple	dull purple
3,5-diglucoside	0.15	0.03	0.08	0.32	purple	purple
Petunidin:						
3-monoglucoside	0.35	0.14	0.04	0.22	purple	dull purple
3-rhamnoglucoside	0.35	0.16	0.13	0.42	purple	dull purple
3,5-diglucoside	0.24	0.04	0.08	0.32	purple	bright
3-rhamnoglucosido-5-glucoside	0.23	0.06	0.37	0.61		purple
Malvidin:						
3-monoglucoside	0.38	0.15	0.06	0.29	mauve	dull mauve
3,5-diglucoside	0.31	0.03	0.13	0.42	mauve	fluorescent
3-rhamnoglucosido-5-glucoside	0.30	0.05	0.40	0.63		cerise



ABE AND HAYASHI[23], to illustrate the relationship between structure and R_F value. The glycosides are the 3-monoglucosides (3G), the 3,5-diglucosides (3G5G) and the 3-rhamnoglucosido-5-glucosides (3RG5G). This latter group of glycosides has only recently been discovered[16,17] and no R_F values have previously been given for its members.

Fig. 2. Graph of the R_F values of the 3-glucosides (3G), 3,5-diglucosides (3G5G) and 3-rhamnoglucosido-5-glucosides (3RG5G) of pelargonidin (Pg), peonidin (Pn), cyanidin (Cy), malvidin (Mv), petunidin (Pt) and delphinidin (Dp).

R_F value and structure

Regular relationships between the R_F value and structure of an anthocyanin have been noted by BATE-SMITH AND WESTALL[28], by ABE AND HAYASHI[23] and by REZNIK[10]. Their results have been amplified by studies in this laboratory and the general conclusions have been shown to hold good for flavones and other polyphenols (see, *e.g.*[28,29]). The results are best considered in relationship to particular structural modifications.

(1) *Hydroxylation.* The greater the number of hydroxyl groups present in the anthocyanidin molecule, the lower the R_F value is, in both alcoholic (BuHCl and

References p. 487/488.

BAW) and aqueous (1% HCl and HAc–HCl) solvents. Thus corresponding glycosides of pelargonidin, cyanidin and delphinidin can always be placed in decreasing order of R_F value.

(2) *Methylation* reverses the effect of hydroxylation, so that the greater the number of methoxyl groups, the higher is the R_F value, again in both types of solvent (see Table IV especially). The increase in R_F value brought about by methylation is rather less than the decrease caused by hydroxylation. Thus the same glycosides of cyanidin and malvidin have rather similar R_F values (Tables III and IV). This effect is observed not only of methylation in the 3′- and 5′-positions in the anthocyanin molecule, but also of methylation in the 7-position, as shown by the figures for hirsutin[28] and rosinin[14].

(3) *Glycosidation*. There is a direct relationship between R_F value and the number of sugar residues which is quite independent of the nature of the anthocyanidin. In aqueous solvents, the effect of glycosidation is to increase R_F values; in BAW or BuHCl, the exact reverse is true (see Fig. 2). This is well illustrated by the figures for the pelargonidin 3-mono-, di- and triglucosides which occur in *Primula sinensis*[17] (Table II). It is also to be noted that this simple relationship is complicated if sugar residues are attached to more than one position in the molecule and also depends on the nature of the sugar–sugar linkage in the case of the 3-biosides[17].

(4) *Acylation* causes an increase in R_F value in solvents based on *n*-butanol, but lowers the R_F value in aqueous solvents. The effect of acylation on R_F value is the reverse of that shown by glycosidation. The R_F values of acylated anthocyanins will be further discussed under section 5.

2. SEPARATION AND PURIFICATION

(*a*) *By paper chromatography*

The first step in the detailed examination of an anthocyanin pigment is that of isolating it in a pure state. It must be separated from other compounds which are extracted from the plant at the same time, namely other anthocyanins, flavone glycosides (co-pigments) and water-soluble substances such as free sugars. The usual chemical methods of isolation are often tedious and wasteful (*cf.*[21]) and do not always yield a pure compound (see, *e.g.* SCOTT-MONCRIEFF[30]). Paper chromatography provides a convenient and rapid alternative means of preparing pure anthocyanins on a small scale without incurring much loss.

The general procedure is similar to that used for flavone glycosides[7,31] and has been described in outline already[17]. An extract of the plant material with methanolic hydrochloric acid is concentrated and applied directly to several sheets of thick filter paper (Whatman No. 3 or 3MM) and chromatography is carried out in BAW, BuHCl or, less frequently, 1% HCl. The anthocyanins appear as clear discrete coloured bands, which are then cut out and the paper eluted with methanol containing hydrochloric acid or acetic acid and the process is repeated twice with the same or a different solvent mixture. It is important to carry out these operations quickly, since solutions

References p. 487/488.

of anthocyanins tend to fade on exposure to light. Anthocyanin bands, when cut into strips five inches long, can be eluted with methanol in a very short time (1–2 hours), especially if they are cut from chromatograns which are only just dry. Pigments which have been left on filter paper strips for several weeks cannot always be completely recovered by elution, due to some irreversible adsorption having taken place. Anthocyanins which occur in very complex mixtures of flavonoids may require further purification on paper and some acylated pigments of closely related structure do not separate well under these conditions (see section 5).

Using these methods, a large number of anthocyanins have been successfully purified in this laboratory. In some instances, sufficient material has been obtained from paper chromatograms to yield the pigment in crystalline form. As many as eight different anthocyanins have been separated from a single plant extract, that of the stems of certain *Primula sinensis* genotypes[32]. Indeed the method is particularly recommended for separating the anthocyanins in plants which contain several such pigments. It has already been used successfully for this purpose with the pigments of grapes[20], potato tubers[15] and of many garden flowers.

(*b*) *By column chromatography*

Column chromatography provides a method of separating anthocyanins on a preparative scale, but the high degree of resolution that can be achieved on filter paper has not yet been duplicated on a column. Mixtures of two or three anthocyanins have been separated by this means[2,3,33,34], but the method is only partially successful with plant extracts containing more than three pigments[35].

Difficulty has been experienced in finding a suitable adsorbent for anthocyanins. They are so strongly adsorbed on to columns of basic salts, such as alumina, that it is not easy to elute them from the column. The choice of eluting solvent is also restricted to those containing *n*-butanol or a similar alcohol and aqueous or methanolic hydrochloric acid. The use of alumina and a specially chosen grade of calcium sulphate by KARRER AND STRONG[2] and KARRER AND WEBER[33] for separating mixtures of two anthocyanins has not found favour in the more recent work of LI AND WAGENKNECHT[3]. These latter authors successfully separated the 3-rhamnoglucoside and 3-diglucoside of cyanidin, present in sour cherries, on silicic acid columns by elution with BAW.

However, the most popular adsorbent for separating anthocyanins is cellulose, but it is clear that the success of the operation is dependent on the grade of cellulose powder[36] and the method of packing[34] employed. ENDO[36] separated the six anthocyanins present in the flowers of *Viola tricolor maxima* on cellulose, but only one particular batch of the powder was really successful. After separation, the column was extruded and the bands cut out and eluted with methanol. CHANDLER AND HARPER[35] in separating six pigments present in blackcurrants on cellulose, eluted the pigments directly from the column. The faster moving anthocyanins had however to be further purified by lead precipitation.

Column chromatography is also used for separating anthocyanins from other components of plant extracts in a preliminary purification in which no separation of

References p. 487/488.

individual pigments is attempted. The anthocyanins are strongly adsorbed on to the column, which can then be washed thoroughly with water to remove impurities. The pigments are then eluted from the column with methanolic hydrochloric acid. Columns of paper[37], lead hydroxide[38] and magnesol–celite (5:1) mixtures[39] have been used for this purpose.

3. CHROMATOGRAPHIC IDENTIFICATION OF ANTHOCYANIDINS AND SUGARS

On acid hydrolysis, anthocyanins give rise to anthocyanidins (aglycones) and sugars. The identification of the aglycone and sugar moieties of unknown pigments is most satisfactorily accomplished by chromatographic comparison on paper with standard markers. The type of procedure to be used has been described by HARBORNE AND SHERRATT[18] and NORDSTRÖM[19] and works well with the amounts of anthocyanin that can be obtained after separation and purification on paper.

The choice of solvent for the chromatography of anthocyanidins is limited by the fact that they are even less stable than the anthocyanins to pH and light. For example, anthocyanidins tend to fade when chromatographed in BAW. For this reason satisfactory solvents for anthocyanidins usually contain mineral acid and the "Forestal" solvent (acetic acid–conc. HCl–water, 30:3:10 v/v) has been widely used[40]. A similar type of solvent system (formic acid–conc. HCl–water, 5:2:3 v/v) is also useful, as with this mixture, anthocyanidins are particularly well separated from unhydrolysed anthocyanin, the presence of which can cause confusion on "Forestal" chromatograms. BAW may be used for anthocyanidins, if the filter paper used is previously washed with dilute hydrochloric acid. A number of other solvent systems have been suggested for anthocyanidins (*e.g.* BuHCl and *m*-cresol–acetic acid–conc. HCl, 1:1:1 v/v) but none of these can be considered to be completely satisfactory due to tailing of the pigment spots and the presence of "chloride" fronts on chromatograms developed with these mixtures. Anthocyanidins have also been separated on a larger scale by column chromatography on cellulose[41] or silicic acid[42].

The regular relationship that exists between R_F value and chemical structure

TABLE V

R_F VALUES AND COLOURS OF ANTHOCYANIDINS

	R_F values in			*Visible*	*Colours in ultra-violet*
	Forestal	*Formic*	*BAW**		
Hirsutidin	0.78	0.36	0.66	purple	mauve
Malvidin	0.60	0.27	0.58	purple	mauve
Petunidin	0.46	0.20	0.52	purple	mauve
Delphinidin	0.32	0.13	0.42	purple	mauve
Rosinidin	0.76	0.39	—	magenta	pink
Peonidin	0.63	0.30	0.71	magenta	pink
Cyanidin	0.49	0.22	0.68	magenta	pink
Pelargonidin	0.68	0.33	0.80	red	orange-red
Luteolinidin	0.61	0.35	0.56	orange	red-brown
Apigeninidin	0.75	0.44	0.74	yellow	yellow-brown

* Run on acid-washed paper.

References p. 487/488.

with the anthocyanins is also found in the anthocyanidin series. The distance travelled in "Forestal" solvent is directly related to the number of free phenolic hydroxyl groups and the most highly hydroxylated anthocyanidin, delphinidin, has the lowest R_F value (Table V). On the other hand, methylation of the hydroxyl groups reverses this effect in a regular way, as can be seen in the series delphinidin, petunidin, malvidin and hirsutidin.

The sugars produced from anthocyanins on acid hydrolysis are identified by the usual chromatographic procedures (for review, see LEDERER AND LEDERER[43]).

The use of either di-*n*-octylmethylamine in chloroform[18] or of ion exchange resins[7] is recommended for the removal of mineral acid from the sugar hydrolysates before chromatography. It is important to distinguish between anthocyanins containing glucose and those containing galactose, so that at least one chromatogram should be developed with a suitable solvent system for 2–3 days, in order to separate these two sugars. At the same time, disaccharides, which are occasionally present in anthocyanin hydrolysates, are more easily detected. When two isomeric 3-diglycosides of the same anthocyanidin are known, for example of pelargonidin[17], the identification of the disaccharides found in this way becomes important.

One difficulty has arisen in this method peculiar to anthocyanins which have been purified by paper chromatography. It has been found[17] that arabinose is produced as an artifact by the action of mineral acid in the solvent system on filter paper. This arabinose then interferes with the normal detection of the sugars and gives misleading results. Other workers (NORDSTRÖM[19], ASEN, SIEGELMAN AND STUART[44]) have also been misled by the presence of arabinose in their sugar hydrolysates arising in this manner[17,37]. The production of arabinose can be avoided by carefully replacing the mineral acid used during the purification process by acetic acid. It has also been found advisable to wash the filter paper before use with dilute acetic acid to remove any soluble impurities.

Anthocyanins purified for sugar analysis should not be contaminated with free sugars or other plant glycosides. Free sugars are readily removed by routinely carrying out chromatography in an aqueous solvent (*e.g.* 15% HAc) during purification. Other plant glycosides are normally removed by using two or more solvent systems during purification, but it is not always possible to be certain that the anthocyanin is finally free from such contamination. Indeed, in two or three instances in this laboratory, incorrect sugar analyses have been attributed to this cause. The remedy is to repeat the sugar analysis on pigment which has been purified in a different set of solvent systems or in the same solvent systems in a different order. It has now become standard practice to do this in all cases where more than one sugar is detected. It should also be noted that anthocyanins which have been purified by column chromatography may be contaminated by free sugars[34,45].

4. DETERMINATION OF THE POSITION AND NUMBER OF SUGAR RESIDUES

The next step in the characterisation of an unknown anthocyanin, once its anthocyanidin and sugars have been identified, is to determine the position and number of

References p. 487/488.

these sugar residues or to find out to which glycosidic "class" the pigment belongs. Paper chromatography provides an excellent method of classifying anthocyanins in this way. Indeed, as a result of using this method, a number of new glycosidic classes have been found[16,17] and the strict classification of anthocyanins into the four "classes" described by the ROBINSONS[13] can no longer be made, since there are now at least ten such "classes" known. It is preferable to describe anthocyanins according to the actual sugars that are present, rather than to use the vaguer terms of the ROBINSONS' terminology, *i.e.* 3-monoside, 3-bioside, etc.

An unknown anthocyanin can be characterised by a careful comparison of its R_F values in several solvent systems with values of well characterised glycosides of the same anthocyanidin. If the unknown compound has the same R_F values as a well characterised glycoside, co-chromatography will confirm the identification. Even if it is not chromatographically identical with any of the known pigments, these data should provide a clear indication of the number of sugar residues present.

Anthocyanins can be further characterised by studying on paper chromatograms the simpler glycosides produced during acid[17,23] or enzymic hydrolysis[46]. The number

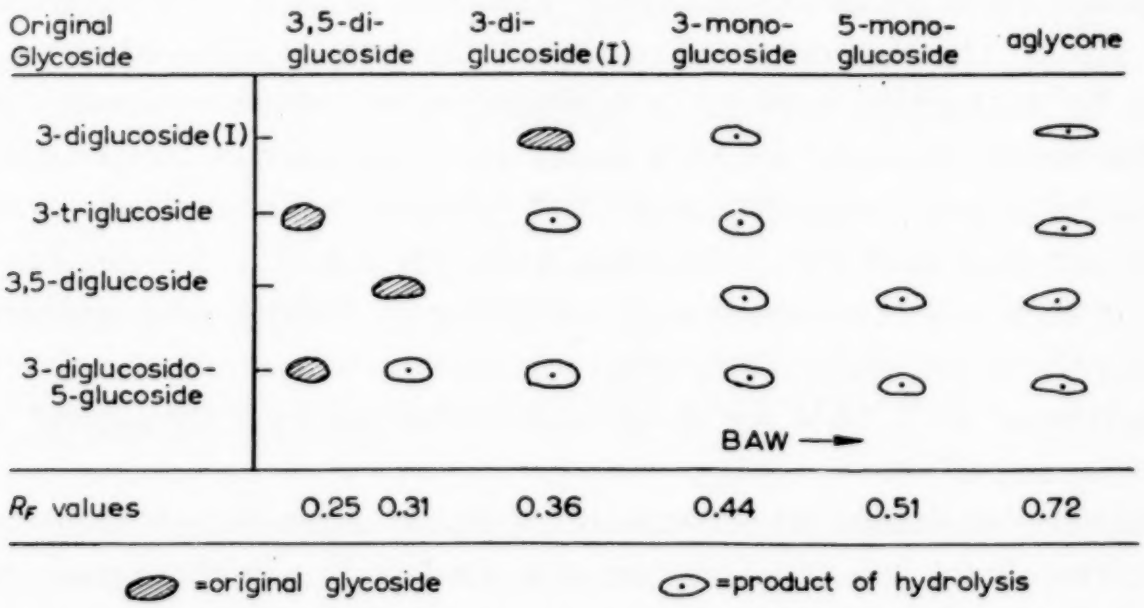


Fig. 3. A chromatogram of the products of controlled acid hydrolysis of some pelargonidin glucosides.

and identity of these simpler glycosides provide a valuable clue to the number and position of the sugar residues in the original glycoside. Thus 3-diglucosides and 3,5-diglucosides are distinguished by the fact that they give one and two simpler glycosides respectively during acid hydrolysis. Anthocyanins containing three sugar residues give two or four simpler glycosides in this way[16,17]. The individual components in the mixture of pigments present when acid hydrolysis is stopped before completion, can be separated and identified on paper chromatograms in the usual manner. The method works particularly well with derivatives of pelargonidin, as can be seen in Fig. 3, which illustrates the general principles of this approach. Alternative solvent systems for separating the glycoside mixtures are BuHCl and 1% HCl.

Identification by the above means depends on having available a number of pigments of known structure. Many of these can easily be obtained directly from plant

References p. 487/488.

sources, as described in the literature[13,21]. The sources of the new pigments isolated in this laboratory are described elsewhere[22]. The author was also fortunate in having a number of anthocyanins both natural and synthetic, which were left over from earlier work at this Institution. If no such specimens are available, it is advisable to check carefully the identity of plant material used for preparing authentic "markers", especially as different "varieties" of the same plant may differ in their pigment content. In addition, some of the earlier pigment identifications have had to be modified by later work[47].

The accuracy of chromatographic identifications made in the above manner depends on the following factors. (1) No exceptions to the very striking relationship between R_F value and number of sugar residues of the anthocyanin in several different solvent systems have yet been found. (2) Isomeric 3-diglucosides of pelargonidin have different chromatographic properties, so that it is possible to distinguish anthocyanins which only differ in the nature of the linkage between the two sugars that are attached. (3) Chromatographic methods will distinguish glycosides in which the sugars are attached in an unusual position. Thus the first 3,7- or 3,4′-glycoside to be found in nature[17], pelargonidin 3-diglucosido-7(or 4′)-glucoside, is chromatographically distinct (see Table II). (4) The high degree of resolution that can be achieved on paper makes it possible to distinguish between 3-monoglycosides, where structural differences between the sugars attached are very small. Thus the pairs of compounds cyanidin 3-monogalactoside and 3-monoglucoside, and cyanidin 3-monoxyloside and 3-monoarabinoside separate in BAW sufficiently, although not into two discrete spots, to show that in such cases two compounds are present[45]. Pelargonidin 3-monoglucoside and 3-monogalactoside are similarly separable and the best results are obtained if the paper is developed with BAW for 36–48 hours, while allowing the solvent to drip off the end of the paper[17,48].

The present limitations of the chromatographic separation of anthocyanins are as follows. The choice of solvent system is limited to two or three main types. The excellent resolutions of different pigments that have been obtained with derivatives of pelargonidin and cyanidin, have not yet been obtained in the delphinidin series. Paper chromatography will not completely resolve acylated anthocyanins if they are of very similar structure.

5. ACYLATED ANTHOCYANINS

Before determining the glycosidic nature of an anthocyanin, it is important to know whether it is acylated or not, since acylation has a profound effect on R_F values. Information on this point can be obtained during the preliminary chromatographic studies. The most characteristic chromatographic feature of acylated pigments is the fact that when they are chromatographed in BuHCl, two spots are shown to be present, a main spot of high R_F value and a minor spot of low R_F. Even if the major component is separated chromatographically from the minor one, on rechromatography two spots will again appear. This point was first noted by DODDS AND LONG[49]

References p. 487/488.

and is due to the fact that the acyl linkage to the anthocyanin is more labile than the sugar linkages. It is therefore impossible to avoid some deacylation taking place during the preparation of an extract of any acylated pigment. On carrying out the deacylation with alkali and then reacidifying, the pigment appears as a single component of low R_F, the spot of high R_F having disappeared.

A simple test for acylation consists of comparing R_F values in different solvent systems of the pigment before and after alkaline treatment. If there is no change in R_F value, the pigment can be assumed to be free of labile acyl groups. All acylated pigments which have been examined so far do change their R_F value under these

TABLE VI

R_F VALUES OF ACYLATED ANTHOCYANINS

Acylated glycosides		*Acyl group*	*BAW*	*BuHCl*	*1% HCl*	*HAc–HCl*
Aglycone	*Sugars**					
Pelargonidin	3RG5G	*p*-coumaric	0.37	0.43	0.27	0.67
Cyanidin	3RG5G	*p*-coumaric	0.32	0.26	0.22	0.62
Peonidin	3RG5G	*p*-coumaric	0.34	0.31	0.22	0.62
Delphinidin	3RG5G	*p*-coumaric	0.31	0.24	0.19	0.59
Petunidin	3RG5G	*p*-coumaric	0.32	0.26	0.19	0.59
Malvidin	3RG5G	*p*-coumaric	0.36	0.28	0.20	0.64
Pelargonidin	3G5G	*p*-coumaric	0.40	0.46	0.19	0.53
Cyanidin	3G5G	*p*-coumaric	0.35	0.34	0.11	0.43
Delphinidin	3G5G	*p*-coumaric	0.30	0.22	0.05	0.32
Pelargonidin	3G5G	caffeic	0.37	0.37	0.17	0.48
Pelargonidin	3GG5G	*p*-coumaric	0.34	0.34	0.49	0.73
Pelargonidin	3GG5G	ferulic	0.34	0.26	0.49	0.73

* Abbreviations: 3RG5G = 3-rhamnoglucosido-5-glucoside; 3G5G = 3,5-diglucoside; 3GG5G = 3-diglucosido-5-glucoside.

conditions. The identification of the acyl component, which is most frequently *p*-hydroxycinnamic acid or a similar organic acid, can also most conveniently be carried out by chromatographic means. The procedures for doing this have been already described[50–53]. The detection of such a compound, after alkaline hydrolysis of the pigment, confirms the identification of that pigment as an acylated anthocyanin.

The R_F values and structures of some typical acylated anthocyanins are given in Table VI. The fact that they are fairly clearly distinguishable in chromatographic behaviour from simple glycosides is illustrated by a comparison of R_F values of simple and acylated derivatives of pelargonidin (see Tables II and VI). As has already been mentioned, acylated derivatives have high R_F values in butanolic solvents, but relatively low R_F values in aqueous solvents. The R_F values of the acylated anthocyanins, shown in Table VI are consistent with differences in structure and the expected regular relationships hold good. It is also to be noted that changes in the acyl group are sufficient to alter R_F values in one or more solvent systems.

One final point about the chromatography of acylated anthocyanins must be made. This is that, in general, they do not separate as satisfactorily as simple glycosides when present together in plant extracts. In some cases when two pigments such

References p. 487/488.

as the acylated 3-rhamnoglucosido-5-glucosides of pelargonidin and peonidin give clearly separated bands on chromatograms, it has been noticed that one of these bands is contaminated by the presence of the other pigment and one or more steps in purification are necessary to free the one pigment from the presence of the second pigment. Mixtures of acylated anthocyanins based on delphinidin, petunidin and malvidin are even more reluctant to separate on paper chromatograms.

6. EXAMPLES OF THE USE OF CHROMATOGRAPHIC METHODS

Chromatographic methods have largely replaced the ROBINSON colour and distribution tests for studying the widespread occurrence of anthocyanins in plants. Thus recent surveys of the anthocyanins in some tropical plants by FORSYTH AND SIMMONDS[27], in mountain plants by HAYASHI AND ABE[54] and in garden plants by REZNIK[10] have all been made by means of paper chromatography. The results are in general agreement with the earlier survey of LAWRENCE, PRICE, ROBINSON AND ROBINSON[12], in which the older methods were used. Chromatographic methods more clearly distinguish mixtures of pigments and the recent work has shown that the complexity of pigmentation in some plants is greater than was earlier supposed. The accuracy of the new methods is however no greater than that of the distribution tests, if identification is based solely on the measurement of R_F values and colour of spots in crude plant extracts. As has been mentioned, the R_F values of anthocyanins in such extracts can be affected by the presence of other components. In addition, a single anthocyanin may give rise to several spots on a chromatogram, if acid or enzymic hydrolysis of acyl or sugar groups takes place during the preparation of the extract. For these reasons, the wide range of values obtained by FORSYTH AND SIMMONDS[27] for cyanidin glycosides present in the plants of Trinidad, does not necessarily indicate a similar range of variation in glycosidic or acylated forms.

There is no doubt, however, that anthocyanins do occur in a greater number of different glycosidic combinations than the earlier work of ROBINSON AND ROBINSON[13] disclosed. The detailed chromatographic examination of more anthocyanins, on the lines of our recent investigation of pelargonidin derivatives[17], will surely reveal some further glycosidic variants.

Chromatographic procedures have also been used for studying in some detail the distribution of anthocyanins within a particular genus or order in connection with taxonomic investigations. A chromatographic examination of the anthocyanins of the petal, base and stamen of five species of *Papaver* has shown that the different species can be distinguished in this way[24]. This is because the distribution of the six anthocyanins in the flowering organs of *Papaver* plants is relatively complex. Chromatographic surveys of the anthocyanidins of the *Primulaceae*[14] and *Solanaceae*[55] have also yielded some results of taxonomic interest. At the same time, a new anthocyanidin, rosinidin was discovered[14] and on the basis of the chromatographic and spectral properties, a structure has been advanced for it. The identification of anthocyanidins

References p. 487/488.

formed from leuco-anthocyanins present in plant tissue has been made with the aid of chromatographic methods[40,56].

The most valuable application of chromatographic methods in the identification of anthocyanins has undoubtedly been and will continue to be in the field of biochemical genetics. The anthocyanins were the first group of plant substances in which the relationship between single genes and simple biochemical differences was demonstrated[57]. Although much work was done in this field by LAWRENCE[57], SCOTT-MONCRIEFF[58] and others, much remains to be done in more detailed and thorough investigations of the pigments present in the colour mutants of garden plants. The limiting factors in this type of investigation are shortage of plant material, the need for identifying all the pigments, including those present in trace amounts, and the difficulty of separating the complex mixtures encountered in the petals of hybrid plants. With the aid of paper chromatography, these difficulties can largely be overcome and considerable progress has been made recently in this field. Some of the results that have been obtained have been briefly summarised by the author[59]. A number of garden plants, in which flower colour variation occurs, have now been examined by chromatographic procedures. They include *Antirrhinum majus*[6], *Cyclamen europeaum*[60,61], *Dahlia variabilis*[7], *Impatiens balsamina*[62], *Primula sinensis*[63], *Streptocarpus*[64], *Solanum phureja*[15,49], and *Viola tricolor*[65].

Finally, chromatographic methods are useful for examining any anthocyanin of which the structure has not been fully determined by earlier investigators. There are many pigments which fall into this category. The presence in nature of new types of anthocyanidins is also revealed by chromatographic investigations[14]. Even if such pigments cannot be fully characterised by means of paper chromatography, it is at least possible to show that they are different from any of the known compounds. For example, the pigment of *Spirodela oligorrhiza*, thought to be a cyanidin glycoside by THIMANN AND EDMONDSON[66], has recently been re-investigated by GEISSMAN AND JURD[67] using chromatographic means. It is clear from these later results that the pigment is not directly related to any of the known anthocyanins.

From the above examples, it will be seen that chromatography has already established itself as a most valuable technique in the study of the anthocyanin plant pigments.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is grateful to Drs. E. C. BATE-SMITH, K. S. DODDS and H. S. A. SHERRATT for their helpful criticism of this manuscript.

REFERENCES

1 R. KUHN AND E. LEDERER, *Ber.*, 64 (1931) 1349.
2 P. KARRER AND F. M. STRONG, *Helv. Chim. Acta*, 19 (1936) 25.
3 K. C. LI AND A. C. WAGENKNECHT, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 979.
4 E. C. BATE-SMITH, *Nature*, 161 (1948) 835.
5 E. C. BATE-SMITH, *Biochem. Soc. Symposia*, No. 3 (1949) 62.
6 T. A. GEISSMAN, E. C. JORGENSEN AND B. L. JOHNSON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 49 (1954) 368.
7 C. G. NORDSTRÖM AND T. SWAIN, *J. Chem. Soc.*, (1953) 2764.

[8] T. B. GAGE, C. D. DOUGLASS AND S. H. WENDER, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1582.
[9] T. A. GEISSMAN, in *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. III, Berlin, 1955, p. 450.
[10] H. REZNIK, *Sitzber. heidelberg. Akad. Wiss. Math.-naturwiss. Kl., Abhandl.*, (1956) 125.
[11] E. LEDERER AND M. LEDERER, *Chromatography*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1957, p. 382.
[12] W. J. C. LAWRENCE, J. R. PRICE, G. M. ROBINSON AND R. ROBINSON, *Phil. Trans. Roy. Soc., London*, B 230 (1939) 149.
[13] G. M. ROBINSON AND R. ROBINSON, *Biochem. J.*, 25 (1931) 1687.
[14] J. B. HARBORNE, *Nature*, 181 (1958) 26.
[15] J. B. HARBORNE, *John Innes Ann. Rept.*, (1957) 25.
[16] J. B. HARBORNE, *Nature*, 179 (1957) 429.
[17] J. B. HARBORNE AND H. S. A. SHERRATT, *Experientia*, 13 (1957) 486.
[18] J. B. HARBORNE AND H. S. A. SHERRATT, *Biochem. J.*, 65 (1957) 23P.
[19] C. G. NORDSTRÖM, *Acta Chem. Scand.*, 10 (1956) 1491.
[20] A. H. BOCKIAN, R. E. KEPNER AND A. D. WEBB, *J. Agr. Food Chem.*, 3 (1955) 695.
[21] S. WAWZONEK, in *Heterocyclic Compounds*, Vol. II, John Wiley & Sons, New York, 1951, p. 277.
[22] J. B. HARBORNE, *Biochem. J.*, in the press.
[23] Y. ABE AND K. HAYASHI, *Botan. Mag. (Tokyo)*, 69 (1956) 577.
[24] R. M. ACHESON, J. L. HARPER AND I. H. MCNAUGHTON, *Nature*, 178 (1956) 1283.
[25] L. PONNIAH AND T. R. SESHADRI, *J. Sci. Ind. Research (India)*, 12B (1953) 605.
[26] P. DUPUIS AND J. PUISAIS, *Compt. rend.*, 240 (1955) 1802.
[27] F. G. C. FORSYTH AND N. W. SIMMONDS, *Proc. Roy. Soc. London*, B 142 (1954) 549.
[28] E. C. BATE-SMITH AND R. G. WESTALL, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 427.
[29] E. A. H. ROBERTS, R. A. CARTWRIGHT AND D. I. WOOD, *J. Sci. Food Agr.*, 7 (1956) 637.
[30] R. SCOTT-MONCRIEFF, *Biochem. J.*, 24 (1930) 767.
[31] T. A. GEISSMAN, J. B. HARBORNE AND M. K. SEIKEL, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 825.
[32] H. S. A. SHERRATT, unpublished results.
[33] P. KARRER AND H. M. WEBER, *Helv. Chim. Acta*, 19 (1936) 1025.
[34] F. G. C. FORSYTH, *Biochem. J.*, 51 (1952) 511.
[35] B. V. CHANDLER AND K. A. HARPER, *Nature*, 181 (1958) 131.
[36] T. ENDO, *Nature*, 179 (1957) 378.
[37] H. W. SIEGELMAN, personal communication.
[38] W. A. ROACH, *Ann. Botany (London)*, n.s. 22 (1958) 127.
[39] J. E. WATKIN, personal communication.
[40] E. C. BATE-SMITH, *Biochem. J.*, 58 (1954) 122.
[41] F. G. C. FORSYTH AND N. W. SIMMONDS, *Nature*, 180 (1957) 247.
[42] E. C. SPAETH AND D. H. ROSENBLATT, *Anal. Chem.*, 22 (1950) 1321.
[43] E. LEDERER AND M. LEDERER, *Chromatography*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1957, p. 245.
[44] S. ASEN, H. W. SIEGELMAN AND N. W. STUART, *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 69 (1957) 561.
[45] F. G. C. FORSYTH AND V. C. QUESNEL, *Biochem. J.*, 65 (1957) 177.
[46] J. B. HARBORNE AND H. S. A. SHERRATT, *Biochem. J.*, 65 (1957) 24P.
[47] H. S. A. SHERRATT, *Nature*, 181 (1958) 26.
[48] R. ROBINSON AND H. SMITH, *Nature*, 175 (1955) 634.
[49] K. S. DODDS AND H. S. LONG, *J. Genet.*, 53 (1955) 136.
[50] T. A. GEISSMAN AND J. B. HARBORNE, *Arch. Biochem. Biophys.*, 55 (1955) 447.
[51] E. C. BATE-SMITH, *Chem. & Ind. (London)*, (1954) 1457.
[52] A. H. WILLIAMS, *Chem. & Ind. (London)*, (1955) 120.
[53] T. SWAIN, *Biochem. J.*, 53 (1953) 200.
[54] K. HAYASHI AND Y. ABE, *Botan. Mag. (Tokyo)*, 69 (1956) 227.
[55] J. B. HARBORNE, *John Innes Ann. Rept.*, (1956) 20.
[56] D. G. ROUX, *Nature*, 179 (1957) 305.
[57] W. J. C. LAWRENCE, *Biochem. Soc. Symposia*, No. 4 (1950) 3.
[58] R. SCOTT-MONCRIEFF, *J. Genet.*, 32 (1936) 117.
[59] J. B. HARBORNE, *Biochem. J.*, 68 (1958) 12P.
[60] W. SEYFFERT, *Z. Abstamm. u. Vererbungslehre*, 87 (1955) 311.
[61] P. WERCKMEISTER, *Züchter*, 24 (1954) 224.
[62] R. E. ALSTON AND C. W. HAGEN, *Genetics*, 43 (1958) 35.
[63] J. B. HARBORNE AND H. S. A. SHERRATT, *Nature*, 181 (1958) 25.
[64] J. B. HARBORNE, unpublished data.
[65] T. ENDO, *Japan J. Botany*, 14 (1954) 187.
[66] K. V. THIMANN AND Y. H. EDMONDSON, *Arch. Biochem.*, 22 (1949) 33.
[67] T. A. GEISSMAN AND L. JURD, *Arch. Biochem. Biophys.*, 56 (1955) 259.

Received June 19th, 1958

METALLIC NITRATES IN PAPER CHROMATOGRAPHY

II. THE SYSTEM METHYL ISOBUTYL KETONE–NITRIC ACID–LITHIUM NITRATE–WATER

A. S. KERTES AND A. H. I. BEN-BASSAT

Department of Inorganic and Analytical Chemistry, The Hebrew University of Jerusalem (Israel)

In continuation of a recent report[1] on the chromatographic behaviour of metallic nitrates in the system methyl isobutyl ketone(MIBK)–nitric acid–water, we have now studied the distribution of nitric acid and lithium nitrate between water and MIBK, and have measured the R_F values of 55 ions in the above mixtures.

A chromatographic study of a large number of ions in one given solvent system may yield numerous useful separations. The R_F values obtained for cations may to a certain extent be related to the distribution coefficients for the same cations obtainable by the extraction technique in the same solvent system. This relationship is rather imperfect, amongst other things, because of the influence of the solvent itself, and of its water and acid content, upon the cellulose and because of the changes in solvent composition that occur during the development of the chromatograms. Thus, a chromatographic study can serve only as a preliminary, but it may provide a basis for possible separations of macro quantities by the extraction technique. With this aim in mind, it appeared necessary and important to carry out a systematic and detailed study of the solvent system itself. Up to the present no attention has been paid to the exact composition of the eluants used in paper chromatography: the distribution of acids, salting-out agents and complexing agents between the aqueous and organic layers has never been determined. A study of this problem should permit a more fundamental interpretation of the R_F values obtained, and in certain cases is likely to serve as a basis for some theoretical considerations.

In radiochemical processes where the dissolution of the fuel is generally carried out with nitric acid, inorganic nitrates are often added to the nitric acid to increase the dissolution rate of the uranium[2]. Sometimes nitrates appear more promising than nitric acid as aqueous salting-out agents in the solution from which the extraction is to be made. Experiments have often shown[3,4] that a much higher partition coefficient is obtained when part of the nitric acid in the aqueous phase is replaced by neutral inorganic nitrates, which themselves are practically insoluble in the organic phase[5]. In the case of extraction with MIBK, the partition coefficient of the extractable species is dependent both on the concentration of nitric acid and of the nitrates in the aqueous phase[6]. The same was found for R_F values in paper chromatography[1]. It is often sufficient to add nitrates to obtain the necessary salting-out strength without

References p. 495.

making the aqueous phase highly acidic. Nitrates with low equivalent weight of the cation, like lithium and magnesium nitrates, were found to be especially useful as salting-out agents[4].

The effects of salts have also been examined in inorganic paper chromatography[7]. The technique employed was impregnation, *i.e.* dipping the paper in salt solution and drying before chromatography. The salting-out effect on uranyl nitrate was found to be identical with that observed in solvent extraction[7]. LEDERER[8] made a comparison of R_F values for several cations on both unimpregnated and sodium chloride-impregnated paper in butanol saturated with N hydrochloric acid. Nitric acid is rarely employed as an eluant in paper chromatography, since the nitrate-complexing of metals is usually small. MIBK does not belong to the organic solvents widely used in paper chromatography and only isolated reports of its use were found in the literature[9].

EXPERIMENTAL

Methyl isobutyl ketone was a "Shell" pure commercial product and was distilled before use from an all-glass Pyrex still; only the middle fraction (114–117°) was retained. "Baker's Analyzed" nitric acid and lithium nitrate were employed.

Initial aqueous solutions, containing varying amounts of nitric acid and lithium nitrate, were prepared by taking aliquots of concentrated non-fuming nitric acid and aliquots of a 6 M lithium nitrate stock solution. Equal volumes of these aqueous solutions and the MIBK were equilibrated at room temperature using the procedure described previously[1]. The changes in volume after equilibration were followed using graduated (0.5 ml) glass-stoppered cylinders; the readings were made with an accuracy of $\pm$ 0.25 ml, the relative error being $\pm$ 0.5%. The distribution of nitric acid between

TABLE I

THE DISTRIBUTION OF NITRIC ACID AND LITHIUM NITRATE BETWEEN WATER AND METHYL ISOBUTYL KETONE

No. of solution	*Moles/l in initial solution*		V_o/V_w	HNO_3		$LiNO_3$	
	HNO_3	$LiNO_3$		a	μ	a	μ
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*
1	1.006	0.212	1.00	0.135	0.135	0.0037	0.0037
2	1.011	0.558	1.00	0.185	0.185	0.0018	0.0018
3	0.996	1.078	1.00	0.281	0.281	0.0015	0.0015
4	1.011	2.260	1.04	0.548	0.571	0.0022	0.0023
5	1.001	3.261	1.06	0.953	1.008	0.0037	0.0039
6	1.006	4.314	1.08	1.574	1.700	0.0053	0.0057
7	0.996	6.300	1.10	3.381	3.719	0.0085	0.0093
8	0.506	1.075	1.00	0.216	0.216	0.0012	0.0012
9	0.996	1.078	1.00	0.281	0.281	0.0015	0.0015
10	2.017	1.076	1.04	0.402	0.418	0.0040	0.0042
11	3.006	1.095	1.09	0.458	0.499	0.0103	0.0112
12	4.001	1.061	1.17	0.512	0.599	0.0288	0.0337
13	6.001	1.065	1.33	0.562	0.747	0.0491	0.0652
14	8.002	1.087	1.53	0.585	0.895	0.0585	0.0895

References p. 495.

water and MIBK was determined potentiometrically using a Beckman Model H2 pH-meter. The aqueous phases were titrated with aqueous sodium hydroxide, and the organic phases with ethanolic sodium hydroxide, the latter being standardized against ethanolic benzoic acid solution. The lithium nitrate content of the phases was measured using an EEL flame photometer. The total amounts of both nitric acid and lithium nitrate found differed from the amounts in the initial aqueous solution by a maximum of $\pm$ 1%. In Expts. 5, 6 and 7 in Table I, the lithium nitrate total was outside this limit of error, apparently because the high concentration of the salt required a dilution of 1:10,000, which was bound to involve considerable error.

The technique and procedure for the chromatographic experiments, the reagents and methods for detection of the spots have been described in previous papers[10].

The working temperature was 23–25°.

RESULTS

Two sets of experiments were carried out. In the first set, Nos. 1 to 7, the original aqueous solution contained a constant amount of nitric acid and the lithium nitrate concentration was varied. In the second set, Nos. 8 to 14, the lithium nitrate concentration in the initial aqueous solution was kept constant and the nitric acid concentration varied. The exact composition of the initial aqueous solution is given in Table I, columns 2 and 3, for nitric acid and lithium nitrate respectively.

The distribution of the salting-out agents, nitric acid and lithium nitrate between the aqueous and organic layers is presented as the concentration distribution coefficient a

$$a = \frac{\text{concentration of salting agent in the organic layer (moles/l)}}{\text{concentration of salting agent in the aqueous layer (moles/l)}}$$

and as the mass distribution coefficient μ, defined as

$$\mu = \frac{\text{total amount of salting agent in the organic layer}}{\text{total amount of salting agent in the aqueous layer}}$$

The relation between these two units is given by $\mu = (V_o/V_w)a$ where V_o and V_w represent the volumes (after equilibration) of the organic and of the aqueous layers respectively. The values for the ratio V_o/V_w are given in column 4 of Table I.

The calculated coefficients for both nitric acid and lithium nitrate are presented in Table I. As can be seen from the values in columns 5 and 6, the solubility of nitric acid in the MIBK layer is greatly influenced by the concentration of lithium nitrate present in the initial aqueous solution. The inorganic nitrate is an excellent salting-out agent for nitric acid[11]: the distribution coefficient of nitric acid increases on increasing the amount of lithium nitrate in the initial aqueous solution. About 12% of the total nitric acid is extracted into the organic layer when the molar ratio of nitric acid to lithium nitrate is approximately 5:1; when this ratio is about 1:5 the amount of nitric acid extracted reaches 75%. On increasing the molarity of the nitric acid in the initial solution from 0.5 to 8 M (Expts. 8–14), the nitric acid extracted increases roughly from 20% to 40%.

References p. 495.

TABLE II

R_F VALUES OF IONS IN METHYL ISOBUTYL KETONE EQUILIBRATED WITH AQUEOUS SOLUTIONS CONTAINING VARIOUS AMOUNTS OF NITRIC ACID AND LITHIUM NITRATE

Ionic solution	*Number of solvent**													
	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*	*13*	*14*
$Th(NO_3)_4$	0.01	0.02	0.03	0.07	0.15 t	0.25 t	0.39 t	0.02	0.03	0.20 t	0.20	0.30	0.50 t	0.73 t
$ZrO(NO_3)_2$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.04	0.08 t	0.19 t
$UO_2(NO_3)_2$	0.28	0.43	0.49	0.61	0.78	0.88	0.94	0.41	0.49	0.75	1.00	1.00	1.00	1.00
$Hg(NO_3)_2$	0.69	0.73	0.73	0.76	1.00	1.00	1.00	0.73	0.73	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
$Bi(NO_3)_3$	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.04	0.06	0.01	0.02	0.04	0.06	0.07	0.08	0.09
$SbCl_3$	0.14	0.22	0.23	0.28	0.36	0.52	0.63	0.23	0.23	0.44	0.57	0.75	0.88	0.94
$SnCl_2$	0.32	0.33	0.36	0.44	0.50	0.54	0.72	0.33	0.36	0.46	0.49	0.51	0.50	0.47
$AsCl_3$	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.04	0.02	0.02	0.02	0.03	0.05	0.06	0.10
$AuCl_3$	0.43	0.45	0.50	0.59	0.70	0.77	0.82	0.41	0.50	0.72	0.91	1.00	1.00	1.00
Na_2SeO_3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.03	0.03	0.05	0.09
NaI	0.19 t	0.25 t	0.29 t	0.60 t	0.64 t	0.69 t	0.88	0.16 t	0.29 t	0.69 t	0.93	1.00	1.00	1.00
$Na_2B_4O_7$	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.07	0.08	0.12	0.15

* Compare the composition of the aqueous solution in Table I.
t = tailing.

As is known, lithium nitrate is only very sparingly soluble in the organic layer. By increasing the molarity of the salt in the initial aqueous solution from 0.2 to 6.5 *M* (Expts. 1–7), the solubility of the lithium nitrate increased from about 0.3% (w/v) to some 0.8%. This uncommon phenomenon is most probably connected with the decreasing pH values of the respective initial aqueous solution. On the other hand, an increased amount of nitric acid in experiments 8–14 leads to an increase of the lithium nitrate solubility in the organic layer from 0.1% to about 7%.

Paper-chromatographic experiments

The R_F values obtained for ions which moved on the paper are presented in Table II. In addition to these, potassium and thallium(I) nitrates and rubidium and cesium chlorides showed an R_F value of 0.01 and 0.02 in solvents 13 and 14 respectively. Zero R_F values in all solvents were found for the following ions spotted on paper as:

$Ba(NO_3)_2$	$Cd(NO_3)_2$	$Ce(NO_3)_4$	$PdCl_2$
$Sr(NO_3)_2$	$Pb(NO_3)_2$	$Cr(NO_3)_3$	PtH_2Cl_4
$Ca(NO_3)_2$	$AgNO_3$	$Gd(NO_3)_3$	$RhCl_3$
$Mg(NO_3)_2$	$Al(NO_3)_3$	$La(NO_3)_3$	$RuCl_3$
$Cu(NO_3)_2$	$Fe(NO_3)_3$	$Nd(NO_3)_3$	$TiCl_3$
$Mn(NO_3)_2$	$In(NO_3)_3$	$Sm(NO_3)_3$	VCl_3
$Ni(NO_3)_2$	$Ga(NO_3)_3$	$Pr(NO_3)_3$	
$Zn(NO_3)_2$	$Y(NO_3)_3$	GeF_4	Na_2TeO_3
$Co(NO_3)_2$	$Tl(NO_3)_3$	NbF_5	Na_2WO_4
$Be(NO_3)_2$	$Ce(NO_3)_3$	TaF_5	$(NH_4)_2MoO_4$

As expected, no qualitative difference was observed between a system containing both lithium nitrate and nitric acid, and the system containing only the latter: the same cations moved in both systems, the only exception being the selenite ion, which only moved in the presence of lithium nitrate.

The observations concerning the stability of the MIBK saturated with high concentrations of nitric acid, and its behaviour as a chromatographic eluant presented in a previous paper[1], hold for the present system too.

DISCUSSION

The formation of nitrato-complexes is limited to uranium and elements resembling it, gold, cerium(IV) and thorium standing out in this respect[12]. The presence of high concentrations of nitrate ions, either as nitric acid and/or as other nitrates, promotes the formation of species more soluble in the organic layer. This is achieved through two actions: first, the nitrate promotes the formation of more soluble di- and trinitrato-complexes, and second, the common ion shifts the equilibrium of the dissociation toward the undissociated mono-nitrato-form, soluble in organic solvents. In the case of gold (III), the above-mentioned influence of the nitrates present in the solution need not necessarily prevail. Since gold nitrate cannot be purchased and its preparation is difficult[4], the gold was spotted as $AuCl_3$. The influence of nitrates in this case is not necessarily attributable to the formation of gold nitrato-complexes. Tin, antimony and arsenic, of which neither nitrates nor nitrato-complexes are known,

References p. 495.

moved on paper as their chlorides. The changes in the R_F values could be ascribed to the differences of acidity in the eluant.

As pointed out, the same qualitative results were obtained when the nitrate in the initial aqueous phase derived either from nitric acid or from lithium nitrate. Quantitatively, there were differences; different R_F values were obtained for the same cation under different conditions. For comparison, curves of the R_F values for a given ion, obtained in the three following systems:

1. varying amounts of nitric acid (in the absence of lithium nitrate),
2. 1 *M* nitric acid and varying amounts of lithium nitrate, and
3. 1 *M* lithium nitrate and varying amounts of nitric acid

were plotted against the total NO_3^- concentration in the corresponding initial aqueous solution. The curves for UO_2, Th, Sb, Sn, Au and Hg are shown in Fig. 1. It appears that at relatively low NO_3^- concentration (up to 2–3 *M*), the R_F values for a given ion do not differ, or differ only slightly, with the source of the nitrate. At higher NO_3^- concentrations, smaller or larger differences are observed. The highest R_F values are obtained when the nitrate ions are derived from nitric acid; lower values are obtained when the nitric acid is partly replaced by lithium nitrate and the lowest values are observed when the source of the nitrate is almost entirely lithium nitrate, with only 1 *M* nitric acid. Thorium behaves somewhat differently, and with bivalent tin the sequence is reversed. It is interesting to compare curves 1 and 2 (Fig. 1) for

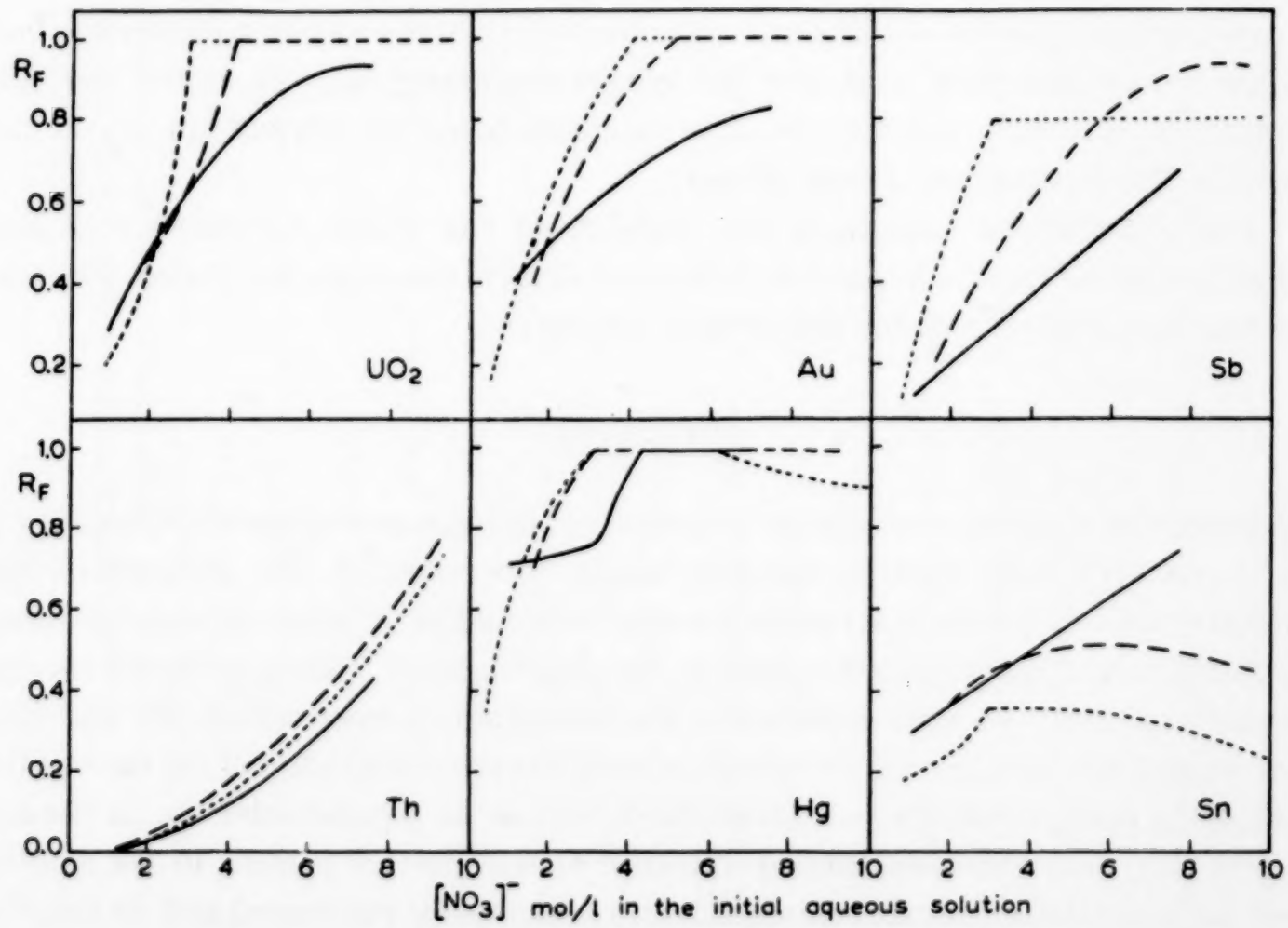


Fig. 1. R_F values of ions plotted against nitrate ion concentration in the initial aqueous solutions. The nitrate ions were derived from: — varying concentrations of lithium nitrate in the presence of 1 *M* nitric acid; — — varying concentrations of nitric acid in the presence of 1 *M* lithium nitrate; – – varying concentrations of nitric acid only.

References p. 495.

the cases of uranyl, mercury and gold. It appears that the 1 *M* lithium nitrate present in the initial aqueous phase has no influence on the R_F values. By deducting nitrate corresponding to a 1 *M* concentration of lithium from curves 2, almost overlapping curves for curves 1 and 2 are obtained. This can be explained on the basis of the results shown in Fig. 2, where the R_F values for the above three ions are plotted

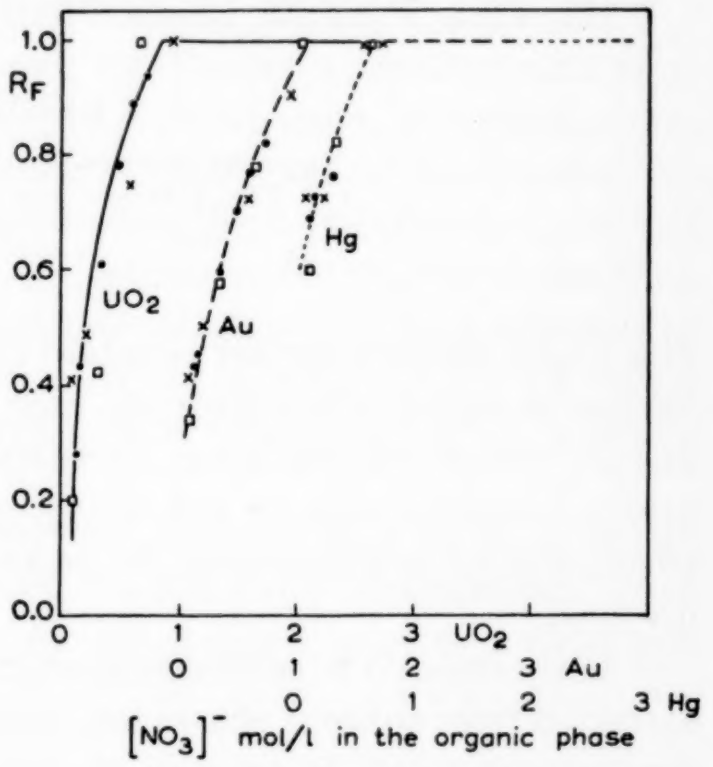


Fig. 2. The R_F values of uranyl, mercury and gold nitrates as a function of nitrate ion concentration in the organic phase. The nitrate ions were derived from: ● varying concentrations of lithium nitrate in the presence of 1 *M* nitric acid; × varying concentrations of nitric acid in the presence of 1 *M* lithium nitrate; □ varying concentrations of nitric acid only.

versus the total NO_3^- concentration in the organic layer only. It can be seen that the R_F values depend roughly upon the total nitrate concentration in the organic layer. Since lithium nitrate is practically absent from the organic phase, its presence in the initial aqueous solution does not influence the R_F values of the above cations.

SUMMARY

The distribution coefficients of nitric acid and lithium nitrate, each in the presence of varying concentrations of the other, between water and methyl isobutyl ketone were determined. The chromatographic behaviour of a number of ions in the above mixtures was studied. It was found that the R_F values of uranyl, thorium and gold nitrates are a function of the nitrate ion concentration in the organic layer.

REFERENCES

1 A. S. KERTES, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 62.
2 R. G. WYMER AND D. L. FOSTER, *Intern. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy, Geneva*, 1955, Paper No. P/547.
3 A. T. GRESKY, *ibid.*, No. P/540.
4 R. BOCK AND E. BOCK, *Z. anorg. u. allgem. Chem.*, 263 (1950) 146.
5 H. A. C. MCKAY, *Intern. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy, Geneva*, 1955, Paper No. P/441.
6 F. R. BRUCE, *ibid.*, No. P/719.
7 E. AND M. LEDERER, *Chromatography*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 2nd Ed., 1957, p. 481.
8 M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 7 (1950) 458.
9 G. CARLESON, *Acta Chem. Scand.*, 8 (1954) 1673;
N. F. KEMBER AND R. A. WELLS, *Analyst*, 80 (1955) 735.
10 S. KERTES AND M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 15 (1956) 543;
R. G. DE CARVALHO, *ibid.*, 16 (1957) 555.
11 K. ALCOCK, F. C. BEDFORD, W. H. HARDWICK AND H. A. C. MCKAY, *J. Inorg. & Nuclear Chem.*, 4 (1957) 100.
12 H. M. IRVING, *Quart. Revs. (London)*, 5 (1951) 200.

Received April 10th, 1958

METALLIC NITRATES IN PAPER CHROMATOGRAPHY

III. THE SYSTEM DI-ISOPROPYL ETHER–NITRIC ACID–WATER

A. S. KERTES AND A. BECK

Department of Inorganic and Analytical Chemistry,
The Hebrew University of Jerusalem (Israel)

This paper presents further results[1,2] on the chromatographic behaviour of metallic nitrates in organic solvents usually used in processes of extraction in radiochemistry. The purpose of this study was to determine the extent to which nitric acid is distributed between the aqueous and di-isopropyl ether phases and to consider the possible effects which this distribution has on the R_F values of metallic nitrates in the system involved.

Early research in solvent extraction disclosed that some metallic species are well extracted from aqueous phases into organic solvents and that some show very low or zero extractability. In practice, the choice of the organic solvent depends upon its selectivity in a desired separation. Di-isopropyl ether is one of the solvents investigated and used in the solvent extraction of fissile and fertile materials[3]. In recent years, it has been very widely used for the extraction of ferric chloride from aqueous solutions containing various concentrations of hydrochloric acid[4] and hydrochloric acid together with other chlorides serving as salting-out agents[5]. The distribution of radiogallium[6] and radioiron[7], and of tri- and pentavalent antimony[8] between aqueous hydrochloric acid and the solvent has been determined. The optimum conditions for the extraction of inorganic chlorides from aqueous hydrochloric acid solutions of varying concentrations have also been studied[9]. Gold has been separated by the extraction technique from group VIII elements using the hydrobromic acid–isopropyl ether system[10]. Ceric, thorium and scandium nitrates have been successfully extracted and separated from some other inextractable nitrates in aqueous nitric acid solution using this solvent[11].

Isopropyl ether has found some application in adsorption chromatography, and also to a lesser degree in paper chromatography, for the separation of antimony from tin[12].

EXPERIMENTAL

The di-isopropylether (DIPE), also known as isopropyl ether $(CH_3)_2 \cdot CH \cdot O \cdot CH \cdot (CH_3)_2$, was a pure commercial product supplied by Shell. As purchased, it may contain, in common with ethers, peroxides formed through contact with air and exposure to light. The peroxides were removed by washing followed by distillation from an all-glass

References p. 500.

Pyrex apparatus, only the middle fraction being retained for use. Immediately before use the ether was tested for the absence of peroxides by the potassium iodide test.

DIPE is soluble to the extent of 1.07% by weight in water, which itself is soluble in the compound up to 0.53% at 20°. The specific gravity at (20°/4°) is 0.7238. The boiling point at 760 mm Hg is 68.5° and the distillation range of 65–70° meets ASTM specifications.

The initial aqueous solutions were prepared by diluting a freshly boiled non-fuming nitric acid stock solution (approximately 14 *M*) with water. The experimental technique of equilibrating the aqueous and etheric phases and of determining the acid content of the phases was similar to the procedure given in previous parts[1,2] of this series. The changes in volume after shaking equal volumes of the two phases were measured in three parallel experiments using graduated, glass-stoppered cylinders of 10, 25 and 50 ml capacity, graduated at 0.1, 0.2 and 0.5 ml respectively. Very good agreement was obtained in three parallel determinations, thus excluding the necessity of averaging the results.

The chromatographic experiments were carried out according to the methods and procedures described in previous publications[13]. Radioactivity measurements were carried out using a mica end-window counter for soft β-rays employing a technique described elsewhere[14].

The working temperature was 22–25°.

RESULTS

Distribution of nitric acid

Table I shows the composition of the initial aqueous solutions, the molar concentrations of nitric acid in the aqueous and organic layers, as well as the calculated concen-

TABLE I

THE DISTRIBUTION OF NITRIC ACID BETWEEN WATER AND DI-ISOPROPYL ETHER

No. of solution	*Concentration of HNO_3 moles/l*			V_o/V_w	a	μ
	in the initial solution	*in the aqueous layer*	*in the organic layer*			
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*
1	0.070	0.069	0.001	1.00	0.012	0.012
2	0.344	0.339	0.003	1.00	0.009	0.009
3	0.685	0.667	0.012	1.00	0.018	0.018
4	1.379	1.327	0.050	1.00	0.038	0.038
5	2.071	1.939	0.129	1.00	0.066	0.066
6	2.770	2.493	0.251	1.00	0.101	0.101
7	4.168	3.463	0.667	1.00	0.193	0.193
8	5.526	4.372	1.282	1.08	0.293	0.316
9	7.197	5.315	2.229	1.22	0.419	0.512
10	8.943	6.438	3.118	1.37	0.484	0.663
11	10.839	8.002	3.970	1.54	0.496	0.772
12	12.642	9.288	4.734	1.69	0.510	0.862

References p. 500.

TABLE II

R_F VALUES OF IONS OBTAINED IN DI-ISOPROPYL ETHER SATURATED WITH VARIOUS CONCENTRATIONS OF AQUEOUS NITRIC ACID SOLUTION

Ionic solution	*Number of solvent**									
	2	*3*	*4*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
$UO_2(NO_3)_2$	0.00	0.01	0.03	0.11 t	0.24 t	0.70 t	1.00	1.00	1.00	1.00
$Th(NO_3)_4$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.20	0.20	0.20	0.20
$SbCl_3$	0.01	0.01	0.02	0.06	0.11	0.24	0.31	0.37	0.36	0.40
$SnCl_2$	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	
$AsCl_3$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.02	0.03	0.02	0.02	0.06
$AuCl_3$	0.19 t	0.19 t	0.29 t	0.92 t	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
$PdCl_2$	0.21 t	0.22 t	0.30 t	0.50 t	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
$AgNO_3$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.08
KI	0.00	0.00	0.31 t	0.42 t	0.63 t	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
$KReO_4$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.18	0.30	0.30	0.28	0.23
Na_2SeO_3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.17	0.33	0.40	
$Na_2B_4O_7$	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.04	0.09	0.03	0.00	0.00
OsO_4	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

* Compare the composition of the solution in Table I.
t = tailing.

tration and mass-distribution coefficients as defined previously[2]. Column 5 gives the ratios of the volumes (after equilibration) of the etheric and aqueous layers.

Reaction of the ether with nitric acid

In the extraction of nitric acid at high concentrations, over 8 *M*, into DIPE, a considerable amount of the acid passes over into the etheric layer, as can be seen from Table I. It was observed that such organic solutions were rather unstable, undergoing violent reaction with the liberation of nitrogen oxides. These reactions were similar to those observed with methyl isobutyl ketone[1,15]. The time required for this reaction in the separated etheric layer depended on the acid concentration. When the aqueous phase contained 8 *M* nitric acid, the etheric phase underwent reaction after 24 h; 10 *M* nitric acid reacted after approximately half the above time and a 12 *M* solution after only a few hours. It was impossible to mix a 14 *M* or more concentrated aqueous solution of nitric acid with DIPE, because of the violent and instantaneous reaction with the ether.

Paper chromatographic experiments

The great majority of the ions investigated showed R_F values equal to zero, whatever the nitric acid concentration. The R_F values of those ions which moved on the paper are presented in Table II. R_F values of zero were obtained for the following elements spotted on filter paper as:

$Ba(NO_3)_2$	$Pb(NO_3)_2$	$Bi(NO_3)_3$	GeF_4
$Sr(NO_3)_2$	$Hg(NO_3)_2$	$In(NO_3)_3$	NbF_5
$Ca(NO_3)_2$	$ZrO(NO_3)_2$	$Ga(NO_3)_3$	TaF_5
$Mg(NO_3)_2$	CsCl	$Y(NO_3)_3$	PtH_2Cl_4
$Be(NO_3)_2$	RbCl	$La(NO_3)_3$	$^{106}Ru(NO_3)_3$

References p. 500.

$Cu(NO_3)_2$	KNO_3	$^{144}Ce(NO_3)_3$	$RhCl_3$
$Co(NO_3)_2$	$TlNO_3$	$Nd(NO_3)_3$	$TiCl_3$
$Ni(NO_3)_2$	$Tl(NO_3)_3$	$Pr(NO_3)_3$	VCl_3
$Cd(NO_3)_2$	$Al(NO_3)_3$	$Sm(NO_3)_3$	TeO_3Na_2
$Mn(NO_3)_2$	$Cr(NO_3)_3$	$Gd(NO_3)_3$	WO_4Na_2
$Zn(NO_3)_2$	$Fe(NO_3)_3$	$Ce(NO_3)_4$	$MoO_4(NH_4)_2$
		$^{160}Tb(NO_3)_3$	

Chromatograms were run in DIPE saturated with the higher concentrations of nitric acid after the solvent had decomposed. The great majority of the ions which showed zero R_F values in non-reacted DIPE solution, gave high R_F values in these solutions. These values were not reproducible. It is very likely that in cases where the acid content in the eluant is high and therefore there is a great probability of numerous reactions between the acid and the ether, the R_F values cannot be attributed to the nitric acid–ether mixtures, but are in part dependent on the various products formed between nitric acid and the di-isopropyl ether.

DISCUSSION

Comparing the R_F values obtained in this study with those obtained previously[1] using methyl isobutyl ketone (MIBK) instead of DIPE, some basic differences are immediately obvious. Uranyl nitrate gave R_F values of unity in MIBK saturated with 3 M nitric acid, whilst for the same extraction using DIPE an approximately 7 M nitric acid solution is needed. Thorium nitrate also showed higher R_F values in the ketone. The same is true for antimony, tin and arsenic. Generally speaking, MIBK extracted the extractable metallic nitrate species more economically with a lower nitric acid concentration level. Zirconyl and mercuric nitrates gave zero R_F values in DIPE, but in the MIBK system both gave R_F values, the value for mercuric nitrate being quite high. The behaviour of the two last-mentioned nitrates seems to be rather important. Zirconyl, being a fission product, is present in fuels and mercury often serves as a good catalyst for the dissolution of the metallic fuel—the dissolution rate is increased by a factor of 10 when mercuric nitrate is added to the nitric acid solution[16]. In contrast to

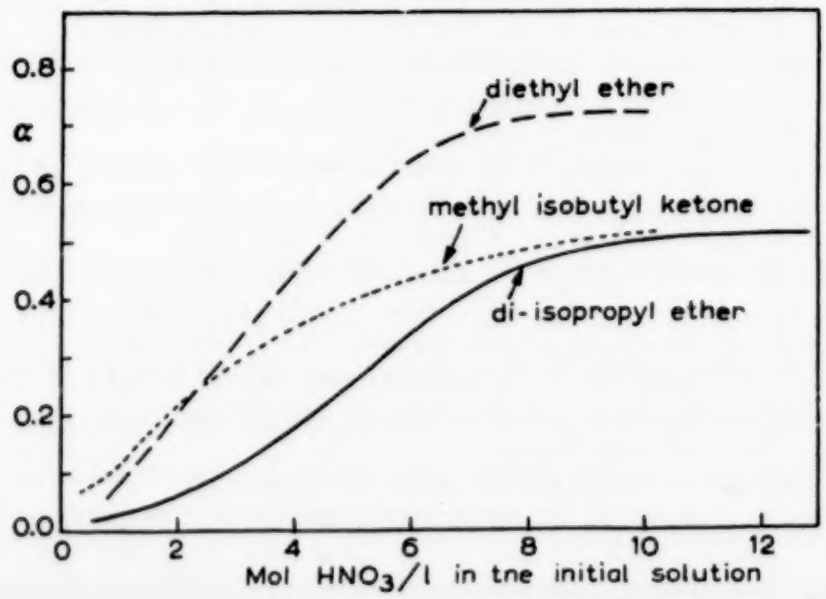


Fig. 1. The distribution coefficient of nitric acid between water and organic solvents as a function of the nitric acid concentration in the initial aqueous solutions.

References p. 500.

DIPE, which as is shown here, does not extract mercuric nitrate, MIBK when used in extraction processes after radiochemical separations must extract mercuric nitrate together with the uranium, according to our previous experiments[1].

In Fig. 1 are plotted the distribution coefficients of nitric acid between water/MIBK and water/DIPE *versus* the molar concentration of nitric acid in the initial aqueous solution. As can be seen, a higher percentage of nitric acid is extracted into MIBK than into DIPE. On studying the influence of lithium nitrate as a salting-out agent upon the R_F values of extractable metallic nitrates[2], it was found that the R_F values of some (uranyl, mercury and gold) ions are a function of the total nitrate ion concentration *in the organic phase*, which serves as the eluant in paper chromatography. As was pointed out above, in order to achieve the same extractability (the same R_F value) of a given metallic nitrate, less nitric acid is needed in the MIBK system than in the DIPE system, in accordance with higher extractability of the nitric acid into MIBK compared with its extractability into DIPE, as is seen from Fig. 1.

For comparison the distribution curve of nitric acid between water and diethyl ether as determined by BOCK AND BOCK[11] is given. On the basis of the above observation it may be predicted that R_F values in diethyl ether should be higher at the same nitric acid concentration level (or the same R_F value for a given metallic nitrate should be reached in diethyl ether with less nitric acid in the initial solution) than in the MIBK and DIPE systems.

SUMMARY

The distribution of nitric acid between water and di-isopropyl ether has been studied for various concentrations of the acid. Chromatograms of 58 ions were run in solvent mixtures of the ether and various concentrations of the acid. The great majority of the ions tested gave zero R_F values. The results were compared with those obtained previously in similar systems containing methyl isobutyl ketone instead of di-isopropyl ether.

REFERENCES

1 A. S. KERTES, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 62.
2 A. S. KERTES AND A. H. I. BEN-BASSAT, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 489.
3 F. R. BRUCE, *Intern. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy, Geneva*, 1955, Paper No. P/719; F. L. CULLER, *ibid.*, No. P/822.
4 N. H. NACHTRIEB AND I. G. CONWAY, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 (1948) 3547; N. H. NACHTRIEB AND R. E. FRYXELL, *ibid.*, 70 (1948) 3552; R. W. DODSON, G. I. FORNEY AND E. H. SWIFT, *ibid.*, 58 (1936) 2573; R. I. MYERS, D. E. METZLER AND E. H. SWIFT, *ibid.*, 72 (1950) 3767; S. D. CAVERS, *Nuclear Sci. Abstr.*, 7 (1953) 5739.
5 A. H. LAURENE, *Nuclear Sci. Abstr.*, 7 (1953) 3037.
6 N. H. NACHTRIEB AND R. E. FRYXELL. *J. Am. Chem. Soc.*, 71 (1949) 4035.
7 G. I. VOSBURGH, L. B. FLEXNER AND D. B. COWIE, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 391.
8 F. C. EDWARDS AND A. F. VOIGT, *Anal. Chem.*, 21 (1949) 1204.
9 D. E. CAMPBELL AND A. H. LAURENE, *Nuclear Sci. Abstr.*, 6 (1952) 3766.
10 W. A. E. MCBRYDE AND I. H. YOE, *Anal. Chem.*, 20 (1948) 1094.
11 R. BOCK AND E. BOCK, *Z. anorg. u. allgem. Chem.*, 263 (1950) 146.
12 F. H. BURSTALL, G. R. DAVIES, R. P. LINSTEAD AND R. A. WELLS, *J. Chem. Soc.*, (1950) 516.
13 S. KERTES AND M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 15 (1956) 543; R. G. DE CARVALHO, *ibid.*, 16 (1957) 555.
14 S. KERTES AND M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 16 (1957) 40.
15 L. E. GLENDENIN, K. F. FLYNN, R. F. BUCHANAN AND E. P. STEINBERG, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 59.
16 R. G. WYMER AND D. L. FOSTER, *Intern. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy, Geneva*, 1955, Paper No. P/547.

Received April 10th, 1958

THE APPLICATION OF PAPER ELECTROPHORESIS TO THE SEPARATION OF RADIOACTIVE PRODUCTS FOUND IN THE SZILARD-CHALMERS REACTION*

J. JACH, H. KAWAHARA** AND G. HARBOTTLE
Department of Chemistry, Brookhaven National Laboratory, Upton, Long Island, N.Y. (U.S.A.)

INTRODUCTION

When the nucleus of an atom captures a thermal neutron and, in de-excitation, emits gamma rays, the atom involved suffers a sharp recoil, the energy of recoil typically amounting to a few hundred electron volts. Since chemical bond energies are only of the order of a few electron volts, it follows that the recoil atom will generally break free of its original molecular combination. This energetic atom will then be slowed down by collisions with neighboring atoms and finally come to rest at thermal energies.

It has been frequently observed that the recoil atom can engage in chemical reactions during or after its slowing-down, such that one finally obtains the radioactivity distributed among a number of chemically separable species[1]. For example, if one studies the distribution of radioactive bromine in neutron-irradiated normal propyl bromide (liquid or solid), one finds bromine activity in the form of both normal and isopropyl bromide, in ethyl and methyl bromide and even in methylene bromide upon fractionation[2]. These chemical effects of nuclear transformation are generally referred to as SZILARD-CHALMERS reactions, after the discoverers[3].

We have been interested in SZILARD-CHALMERS reactions in crystalline inorganic substances, and have found that the method of paper electrophoresis provides a valuable tool for the separation and quantitative estimation of the various chemical species synthesized by the nuclear recoil process. The use of paper electrophoresis for this purpose was first suggested by CROATTO, GIACOMELLO AND MADDOCK[4] who employed it in the analysis of irradiated sodium chloriridate. For studies of this type we believe that paper electrophoresis offers several outstanding advantages over ordinary wet-chemistry separations. (1) Quantitative estimations of the various radioactive fractions are easily obtained by merely summing the counting rates under the different peaks. Furthermore, one can be certain that account is taken of all the radioactivity in the solution as there are no losses due to adsorption on the walls of vessels, incomplete phase separation in extraction techniques, incomplete precipitation, etc. (2) The method gives an unequivocal determination of the sign of charge of an unknown species. (3) Electrophoresis on paper is remarkably sensitive

* Research performed under the auspices of the U.S. Atomic Energy Commission.
** Guest Research Collaborator from the Chemistry Laboratory, Otaru College of Commerce, Otaru, Japan.

References p. 507.

in separating species which are weakly radioactive (*i.e.* present in only small yield) from other species which carry the bulk of the radioactivity. Thus one can separate, and accurately estimate, species carrying $\sim 1\%$ or less of the total radioactivity without danger of cross-contamination. (4) One may help confirm the identification of unknown species by comparing their migration rates with those of known specimens. (5) The position of the parent species may usually be established by chemical tests, since in a SZILARD-CHALMERS study it is the only species present in macroscopic quantities.

EQUIPMENT

The paper-electrophoresis apparatus consisted of two glass plates 45 cm square resting on tanks which were ordinary Pyrex oven casseroles. The surfaces of the plates touching the paper were treated with "Drifilm" to prevent wetting. Provision was made for cooling the upper plate with water when necessary. Strips of Whatman 3 MM paper were cut 55 cm long by either 3.8 or 1 cm wide: these strips were ruled off in centimeters and were trimmed, at the ends, into "tails" about 2 mm wide which dipped into the tanks. The purpose of this was to prevent excessive entry of electrolyte from the tanks into the ends of the paper, while maintaining electrical contact. Before use these papers were soaked for a few seconds in the electrolyte solution desired and firmly blotted for *ca.* 3 minutes between sheets of absorbent "Kimpak". The solution of irradiated crystals to be examined was then placed at the zero-line on the paper by means of a lambda-pipette: volumes of 3 to 10 λ were generally employed. The paper was firmly clamped between glass plates, and electrical contact was made through graphite electrodes dipping in the electrolyte tanks. Potentials of 450–700 V D.C. were applied (10–16 V/cm gradient). The entire high-voltage end of the apparatus was surrounded by a plastic shield to prevent accidental contact and electrical injury to personnel. Currents were usually a few milliamps. which did not generally cause serious heating of the paper.

After 2–5 hours the voltage was cut off, the apparatus disassembled and the paper dried by a current of warm air from a hair-dryer. When dry the paper was cut into sections 1 cm long which were counted in reproducible geometry with an end window proportional counter, if beta radioactivity was determined, or a scintillation counter for gamma radiation. The radiation characteristics and rate of decay of individual fractions could be easily checked to confirm the identity of the radioactivity present at various points along the paper.

EXPERIMENTAL RESULTS

(*a*) *Alkali bromates*

It is well-known that when crystalline alkali bromates are irradiated, radioactive bromine is found in both the bromate and bromide form[5]. The percentage found as bromate is usually $\sim 10\%$[6]. When irradiated alkali bromates were dissolved in 0.1 *N* NaOH and subjected to electrophoresis on paper saturated with 0.01 *N* NaOH,

References p. 507.

histograms similar to Fig. 1 were obtained. In this plot, as in all others in this paper, the ions start from the dashed vertical line and anions move to the right. The peak farthest to the right is bromide, the adjacent one being bromate. Two other, very

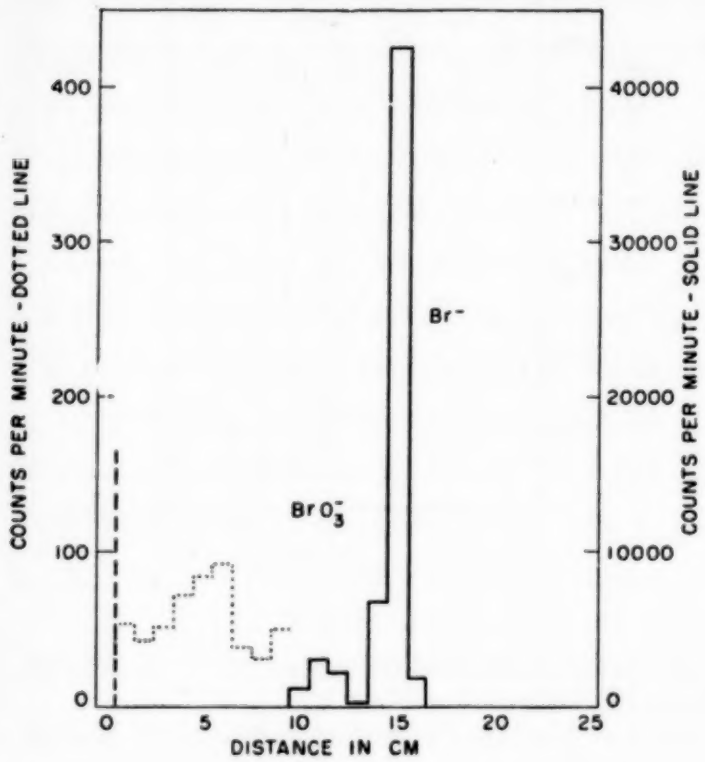


Fig. 1

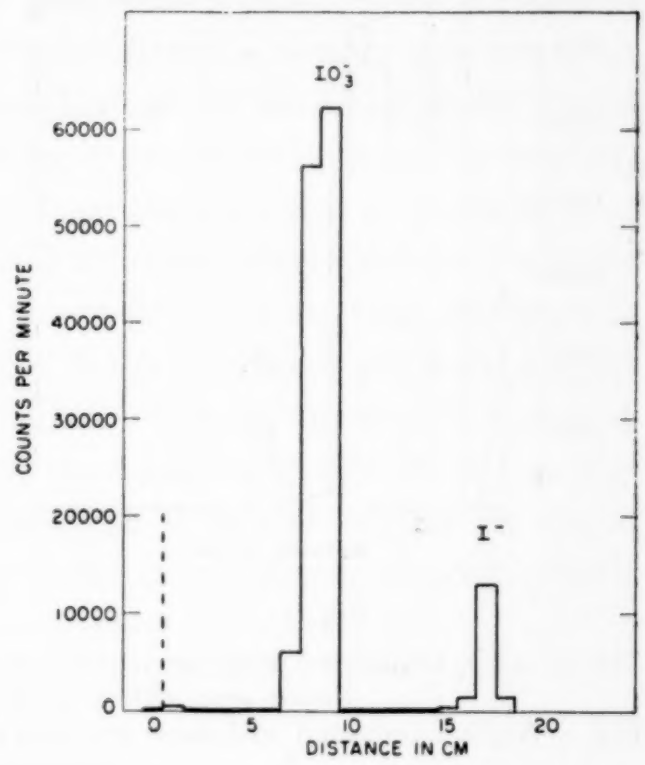


Fig. 2

Fig. 1. $CsBrO_3$ irradiated with neutrons and dissolved in 0.1 *N* NaOH. Paper wet with 0.01 *N* NaOH. Running time 1.5 h at 600 V.

Fig. 2. KIO_3 irradiated with neutrons and dissolved in 0.1 *N* NaOH. Paper wet with 0.01 *N* NaOH. Running time *ca.* 1.5 h at 600 V.

much smaller, peaks were observed: these appear in the histogram as the dotted curve, whose ordinates are given on a separate scale. The small peak at the origin is probably formed by an irreversible reaction of some component in the solution with the paper, but the identity of the small peak at 5–6 cm could not be established. It is an anionic species and was shown to contain bromine by analysis of its radiation characteristics. The small peak was shown not to be hypobromite by its continued appearance even when sulfite was added to the dissolution medium. It is likely that a conventional chemical analysis would not have detected this component.

The electrophoresis method also effects a separation of the bromine anions from radioactive cations (sodium, potassium, rubidium and cesium) simultaneously formed during neutron irradiation as these species move in the opposite direction and are eliminated.

The relative rates of motion of bromide and bromate ions in paper electrophoresis have been previously reported by GROSS[7] and LEDERER[8] in ammonium carbonate solutions. They find that the ratio of the velocity of bromide to that of bromate is 1.41 and 1.24 respectively. We obtain, for 0.01 *N* NaOH, a ratio of 1.26.

(*b*) *Potassium iodate and periodate*

When crystalline potassium iodate is irradiated with neutrons most of the radioactive iodine is found after dissolution in water in the form of iodate and iodide, with no

References p. 507.

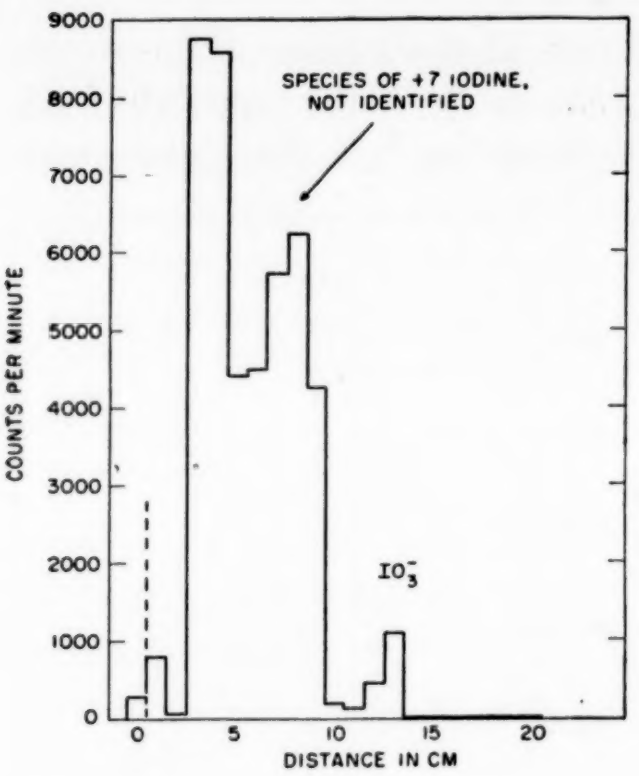


Fig. 3

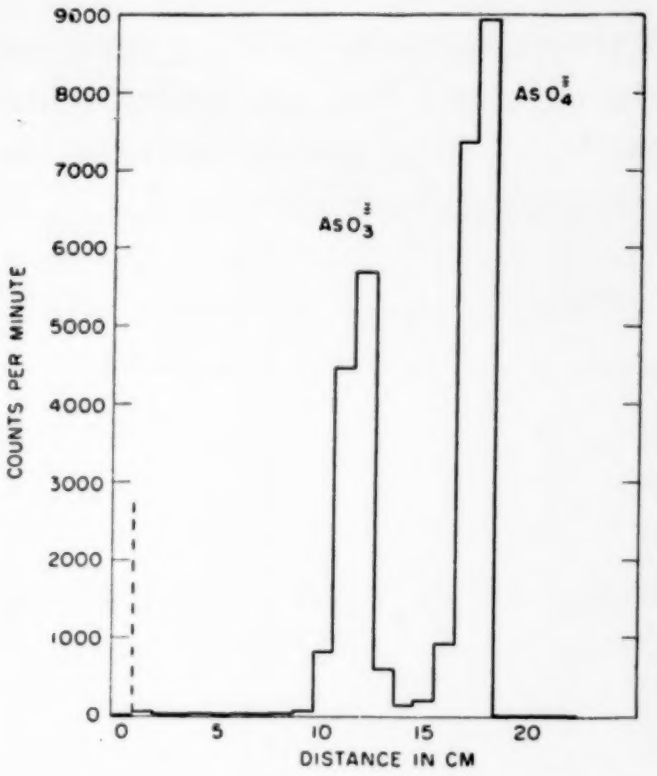


Fig. 4

Fig. 3. KIO_4 irradiated with neutrons, annealed at 240° for 15 min, and dissolved in 0.1 *N* NaOH. Paper wet with 0.01 *N* NaOH. Running time 2 h at 600 V.
Fig. 4. As_2O_5 irradiated with neutrons and dissolved in 0.1 *N* NaOH. Paper wet with 0.01 *N* NaOH. Running time 2 h at 600 V.

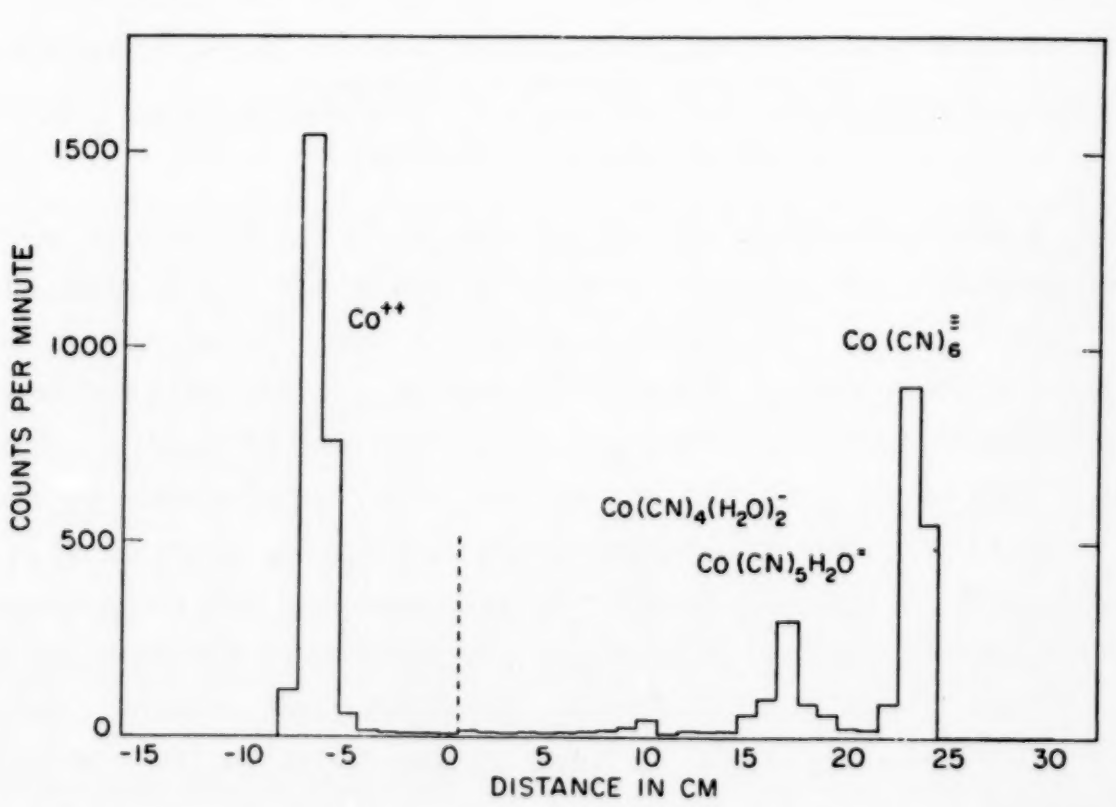


Fig. 5. $K_3Co(CN)_6$ irradiated with neutrons and dissolved in pH 5.4 buffer. Paper wet with pH 5.4 buffer. Running time *ca.* 3 h at 600 V.

detectable periodate[9]. Under the same conditions as for bromate above, we obtained histograms of which Fig. 2 is a typical example. The iodate and iodide peaks are seen to be clearly resolved. There is no evidence of a large periodate peak in this histogram, in agreement with other methods of analysis.

In the case of potassium periodate, ATEN *et al.*[10] have shown that the neutron irradiation produces about 10% I^-, 86% IO_3^- and 4% IO_4^-. However, they found

References p. 507.

that when the irradiated crystals were annealed at temperatures ~ 100° the species which produce I^- on dissolution passed over into species producing IO_3^- while at higher temperatures the IO_3^- began to go over to IO_4^-. Under annealing at 240° for 15 minutes they found no iodide, ~ 80% IO_4^- and ~ 20% IO_3^-. Since we wished to observe the electrophoresis behavior of IO_4^- we irradiated a sample with neutrons and annealed it for 15 minutes at 240°. A typical histogram obtained under these conditions is shown in Fig. 3; this experiment was repeated several times. The individual fractions on the paper were chemically tested for the presence of periodate by spotting with an acidic starch–iodide solution. A blue color developed for fractions lying at 9 cm and lower, but not for the peak at 12–13 cm, showing that this peak is not periodate but that the large twin peaks at 3–4 cm and 7–8 cm are both species of + 7 iodine, as well as the peak at the origin. Had iodide been present, it would have appeared at strip 17 or beyond. Evidently, the separate peaks of + 7 iodine represent different ionic forms not in rapid equilibrium with one another in dilute base. These species may be IO_4^- and related ions, as for example species arising from

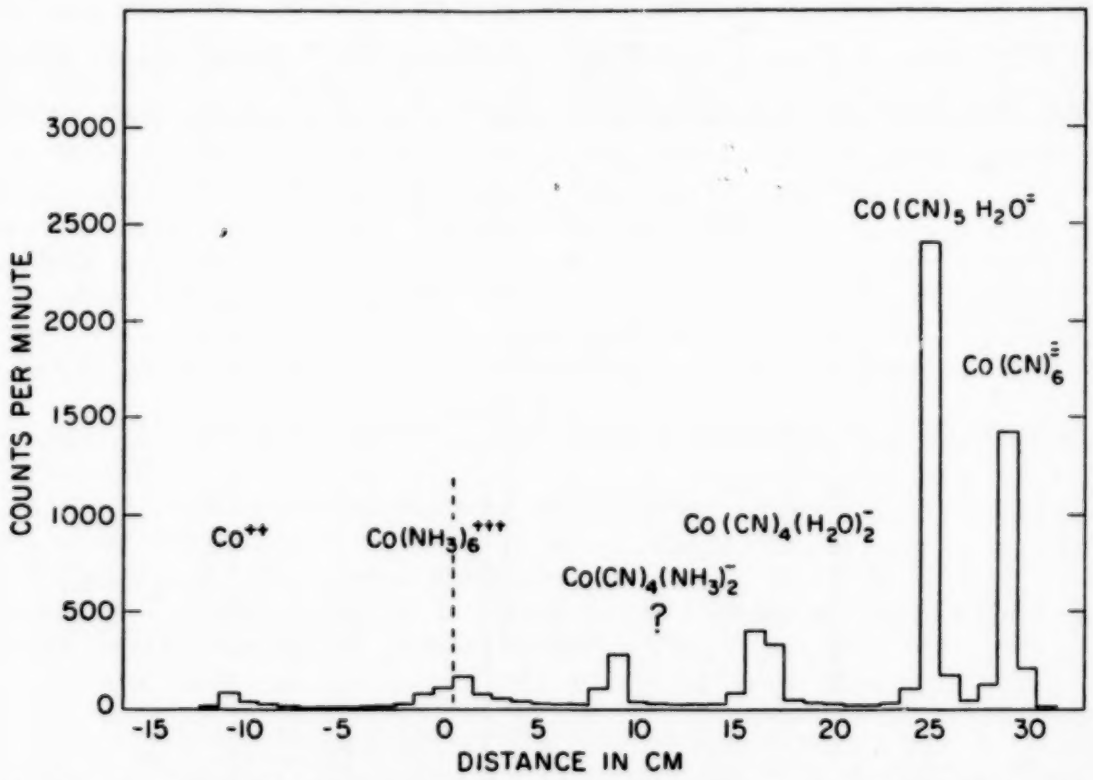


Fig. 6. $K_3Co(CN)_6$ irradiated with neutrons and dissolved in conc. NH_4OH. Paper wet with pH 5.4 buffer. Running time *ca.* 4 h at 600–650 V.

the acids H_5IO_6 or $H_4I_2O_9$, which have been reported in the literature[11].

The sequence of velocities for paper electrophoresis in a basic medium, $I^- > IO_3^- > IO_4^-$ has been previously reported by GROSS[7] who studied iodide and iodate, and LEDERER[8], who reported on all three. LEDERER also found that periodate gives two spots and a "reduction comet". We do not observe reduction on Whatman 3 MM paper wet with 0.01 *N* NaOH and seem to find three spots: it is possible however that one of these may be a spurious "stain" due to irreversible reaction with the paper at the starting line.

(c) *Arsenite–arsenate*

We have also employed paper electrophoresis to separate tri- and quinquevalent

arsenic formed by neutron capture in As_2O_5 (solid). A typical histogram is presented in Fig. 4: here the neutron-irradiated As_2O_5 was dissolved in 0.1 *N* NaOH and the paper was soaked in 0.01 *N* NaOH. LEDERER[8] has also given data on arsenate and arsenite in basic solution. He finds that (in 2% ammonium carbonate) the ratio of velocities of arsenate to arsenite is 1.67. We find a ratio of 1.54. Our data (Fig. 4) also indicate the production of a small quantity of elementary arsenic, which remains at the origin.

(*d*) *Potassium cobalticyanide*

A study of the recoil reactions of cobalt in potassium cobalticyanide has recently been completed in this laboratory[12]. The paper electrophoresis method was used to separate the complex ionic species containing cobalt from one another and from cobaltous ion. The first histogram (Fig. 5) shows the distribution of cobalt activity when the neutron-irradiated salt was dissolved in pH 5.4 buffer: in this plot are seen peaks corresponding to cobaltous ion (in the cation direction) and to several anionic species formed by reaction of partially-stripped radioactive cobalt-cyanide fragments with water. The second histogram (Fig. 6) shows the distribution when the same material was dissolved in concentrated ammonia: the paper was again wet with

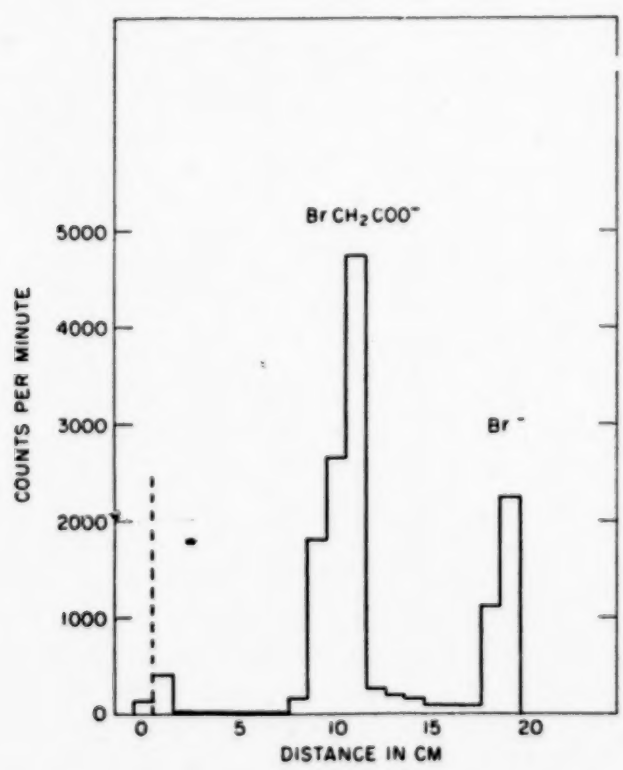


Fig. 7. $BrCH_2COOH$ irradiated with neutrons and dissolved in 0.1 *N* NaOH. Paper wet with 0.01 *N* NaOH. Running time *ca.* 1.5 h at 600 V.

pH 5.4 buffer. Here two new peaks have appeared, at ~ 9 cm and at the origin. The peak at the origin is $Co(NH_3)_6^{+++}$ formed by the air-oxidation of Co^{++} in ammoniacal solution. The peak at ~ 9 cm is a species whose identy it was not possible to establish definitely, but is probably a mixed cyano-ammino cobaltate such as $Co(NH_3)_2(CN)_4^-$.

These examples demonstrate an application of paper electrophoresis which has already been exploited by several workers[13, 14, 15], namely, the separation and iden-

References p. 507.

tification of complex ions of the transition groups, in connection with analytical, synthetic or kinetic studies.

(*e*) *Bromacetate–bromide*

In these experiments bromacetic acid was irradiated with neutrons and dissolved in 0.1 *N* NaOH. A typical histogram, showing the separation of bromacetate and bromide ions, is shown in Fig. 7.

SUMMARY

It has been shown by these examples that the technique of paper electrophoresis, using inexpensive equipment which can be put together in almost any laboratory, is capable of separating many of the radioactive ionic species formed in typical SZILARD-CHALMERS reactions, and is also useful in assisting in their identification.

REFERENCES

[1] J. E. WILLARD, *Ann. Rev. Nuclear Sci.*, 3 (1953);
A. C. WAHL AND N. A. BONNER, *Radioactivity Applied to Chemistry*, J. Wiley and Sons, New York, 1951, chap. 8.
[2] M. S. FOX AND W. F. LIBBY, *J. Chem. Phys.*, 20 (1952) 487.
[3] L. SZILARD AND T. A. CHALMERS, *Nature*, 134 (1934) 462.
[4] U. CROATTO, G. GIACOMELLO AND A. G. MADDOCK, *Ricerca sci.*, 21, No 10 (1951) 1788.
[5] G. E. BOYD, J. W. COBBLE AND S. WEXLER, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 237;
J. W. COBBLE AND G. E. BOYD, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 1282.
[6] J. JACH AND G. HARBOTTLE, *Trans. Faraday Soc.*, 54 (1958) 520.
[7] D. GROSS, *Chem. and Ind.* (London), (1957) 1597.
[8] M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 17 (1957) 606.
[9] R. E. CLEARY, W. H. HAMILL AND R. R. WILLIAMS, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4675.
[10] A. H. W. ATEN, G. K. KOCH, G. A. WESSELINK AND A. M. DE ROOS, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 63.
[11] N. V. SIDGWICK, *The Chemical Elements and Their Compounds*, Vol. II, Oxford Univ. Press, 1950, p. 1236 *et seq.*
[12] H. RAUSCHER AND G. HARBOTTLE, *J. Inorg. and Nuclear Chem.*, 4 (1957) 155.
[13] S. KERTES AND M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 16 (1957) 40.
[14] S. G. SHUTTLEWORTH, *J. Am. Leather Chemists' Assoc.*, 49 (1954) 598.
[15] A. KAWAMURA, H. OKAMURA AND N. KANEKO, *Japan Analyst*, 4 (1955) 157;
A. KAWAMURA AND H. OKAMURA, *Japan Analyst*, 4 (1955) 163.

Received March 28th, 1958

GAS LIQUID PARTITION CHROMATOGRAPHY OF MIXTURES OF METHYLENECYCLOHEXANE AND THE ISOMERIC METHYLCYCLOHEXENES*

E. GIL-AV, J. HERLING AND J. SHABTAI
The Daniel Sieff Research Institute, The Weizmann Institute of Science, Rehovoth (Israel)

In the course of a study of the aromatization of paraffinic and naphthenic hydrocarbons[1], the need arose for a method of quantitative determination of the individual methylcyclohexenes and methylenecyclohexane in mixtures containing some or all of these isomers. Likewise, in the investigation of the Diels-Alder addition of butadiene to propylene[1] a fraction was obtained, which contained not only the expected 4-methylcyclohexene, but all the possible methylcyclohexene isomers. The study of the isomerization of the methylcyclohexenes and of the direction of dehydration of the corresponding alcohols are other obvious cases where such a method is required.

An inspection of the boiling points of the compounds, listed in Table I, shows that three of the isomers boil in a range of only 1.5°, so that their analysis by fractional distillation is not practicable.

TABLE I

PHYSICAL PROPERTIES OF METHYLENECYCLOHEXANE AND THE ISOMERIC METHYLCYCLOHEXENES

Compound	*B.p.(°C)**	n_D^{20}*	R_V/R_V *ethylbenzene*
1-Methylcyclohexene	110.0	1.4503	0.42
3-Methylcyclohexene	104.0	1.4444	1.65
4-Methylcyclohexene	102.7	1.4414	1.49
Methylenecyclohexane	103.3	1.4497	2.99

* According to FERRIS[2].

Infrared absorption, on the other hand, permits complete analysis of the mixture as shown by PINCHAS, SHABTAI AND GIL-AV[3]. However, since gas liquid partition chromatography (G.L.P.C.) is usually more rapid, analysis by this method was also investigated. The results are reported in the present paper.

The first experiments with G.L.P.C. were not very successful. When paraffin or octoil was used as the liquid phase, only two peaks appeared in the chromatogram, of which one corresponded to 1-methylcyclohexene and the other to the rest of the components (Fig. 1). An attempt to increase the selectivity of the liquid phase by choosing a more polar substance, such as N-dimethylformamide[4], which is effective in the separation of butene-1 (b.p. = —6.3°) from isobutene (b.p. = —6.9°), failed in the

* Preliminary communication: *Chem. & Ind. (London)*, 45 (1957) 1483.

References p. 512.

case under investigation. Finally, glycol, saturated with silver nitrate, was tried, since this liquid phase, which forms complexes with unsaturated compounds, has been used with much success for the separation of the C_4 olefins[5]. It was found that a surprisingly good separation of the methylcyclohexenes took place.

The retention volumes of the different isomers are given in Table I. They are corrected for dead volume and expressed relative to ethylbenzene, which was used

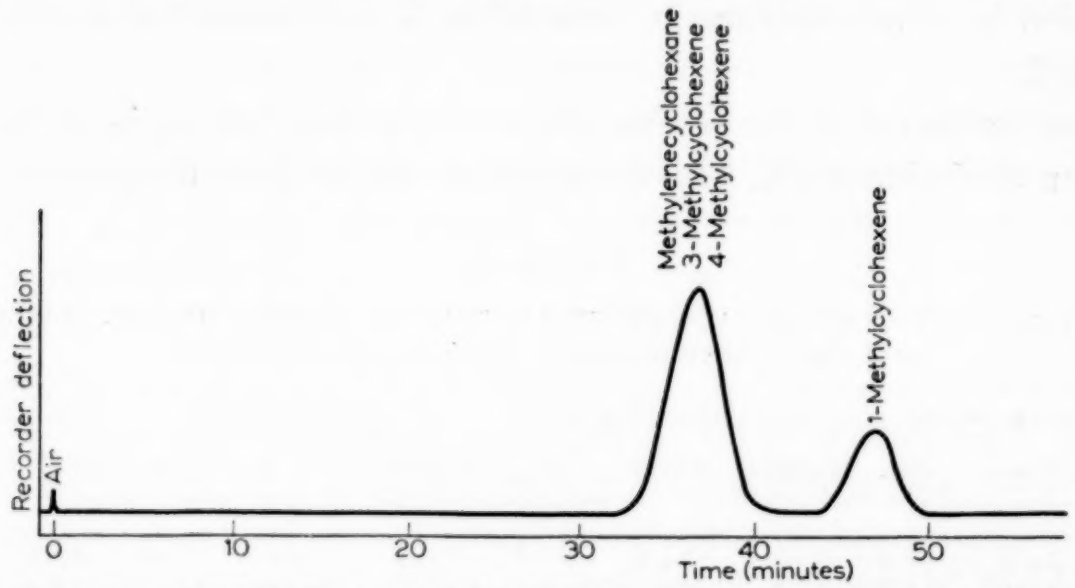


Fig. 1. Chromatogram of a mixture containing equal quantities of the three isomeric methylcyclohexenes and methylenecyclohexane on a 2 m column with paraffin wax as the stationary phase at 80°. Hydrogen flow rate 63 cm³/min.

as the internal standard. The separation, which can be achieved on a two meter column, is shown in Fig. 2. The order of emergence of the four isomers differs from that of the boiling points, in contrast to their behaviour in paraffin wax and in octoil, where only simple solubility is involved. This could be due to the fact that the stability of the complexes formed in the silver nitrate/glycol phase, is greatly influenced by steric factors, as shown by WINSTEIN AND LUCAS[6]. The retention volume should therefore depend not only on the volatility but also on the number of substituents around the double bond and their spatial configuration.

The accuracy of the quantitative determination of the various isomers by this

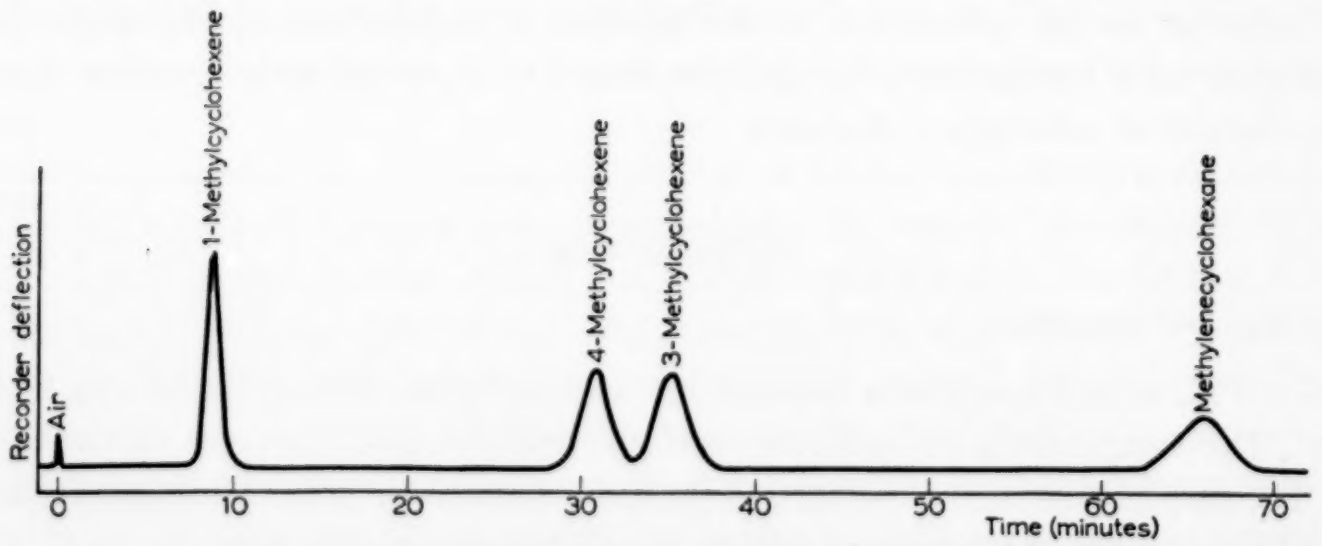


Fig. 2. Chromatogram of a mixture of the three isomeric methylcyclohexenes and methylenecyclohexane on a 2 m column with a saturated silver nitrate/glycol solution as the stationary phase at 30°. Helium flow rate 66 cm³/min.

References p. 512.

method was checked on a number of synthetic blends. The details of the procedure are given in the experimental section and the results are listed in Table II. The amount of the different components was determined by the method of integration, that is, the area of each peak was determined by multiplying its height by its half band width, and hence, the concentrations were calculated by dividing the areas of the respective peaks over the sum total of the peak areas. Slight drift of the zero line, which occurred in some experiments, was taken into account by drawing the base line accordingly.

The mean deviation of the results was no more than 0.6–0.7% of the total and the maximum deviation 1.2%. This is somewhat better than the accuracy obtained

TABLE II

DEVIATIONS IN ANALYSIS OF SYNTHETIC BLENDS OF METHYLENECYCLOHEXANE AND THE THREE ISOMERIC METHYLCYCLOHEXENES

Mixture No.	*% Methylenecyclohexane*			*% 1-Methylcyclohexene*			*% 3-Methylcyclohexene*			*% 4-Methylcyclohexene*		
	Weighed	*Found*	*Dev.*	*Weighed*	*Found*	*Dev.*	*Weighed*	*Found*	*Dev.*	*Weighed*	*Found*	*Dev.*
1	25.5	24.3	—1.2	25.0	24.4	—0.6	22.3	23.1	+0.8	27.2	28.2	+1.0
2	29.7	30.7	+1.0	16.2	15.1	—1.1	32.1	32.2	+0.1	22.0	22.0	0.0
3	11.6	12.3	+0.7	11.0	10.5	—0.5	26.2	26.9	+0.7	51.2	50.3	—0.9
4	45.3	45.3	0.0	9.2	8.8	—0.4	10.0	11.0	+1.0	35.5	34.9	—0.6
5	24.4	24.3	—0.1	9.6	9.3	—0.3	33.3	32.9	—0.4	32.7	33.5	+0.8
Mean deviation			0.6			0.6			0.6			0.7

by the infrared absorption method[3]. The results show that the thermal conductivities of the four isomers are sufficiently near to each other to make a calibration for each component unnecessary.

The peaks of the 3-methyl and the 4-methyl isomers tend to overlap somewhat, particularly if the column is overcharged. In the experiments, listed in Table II, overlapping was negligible, but it was found that even when visual inspection of the chromatogram revealed definite overlapping, the accuracy of the results, as calculated by the above method, was not seriously affected. In cases in which, however, a doubt could arise as to the correctness of the method of calculation of the areas corresponding to these two isomers, the analysis should be repeated with a smaller sample, or the method of calculation changed.

EXPERIMENTAL

Apparatus and procedure

The G.L.P.C. experiments were carried out with a Perkin Elmer Model 154 Fractometer[7]. The temperature of operation was 30° and the inlet pressure of the gas 17 p.s.i. The rate of flow of the carrier gas (helium) was 66 cm^3/min. The recorder range was set to a sensitivity corresponding to 80 mV full range deflection.

The solid phase was prepared by grinding diatomaceous earth fire brick (Johns-Manville C-22) to 50–80 mesh, washing it with 4% nitric acid, eliminating the finse

References p. 512.

by sedimentation in water for 3 min and drying at 120°. Two parts of solid support were coated with one part of saturated silver nitrate/glycol solution and filled into U-shaped pyrex tubes of 4.2 mm diameter and 1 m length. Two such tubes were connected in series through fittings available in the instrument, giving a total column length of 2 m.

The samples were introduced into the column with a hypodermic syringe; their size was of the order of 0.005 ml. Ethylbenzene was chosen as the internal standard for the determination of the relative retention volumes, since it corresponded better than any other compound tried to the recommended properties of internal standards[8].

When determining the retention volumes of the pure compounds, special care was taken not to overcharge the column in order to obtain perfectly symmetrical peaks on the chromatogram.

Materials

1-Methylcyclohexene. Cyclohexanone was converted by Grignard reaction into 1-methylcyclohexanol, which was then dehydrated over aluminium sulfate, according to the procedure of SIGNAIGO AND CRAMER[9]. 80 ml of the olefinic product were purified by fractionation on a Hypercal Podbielniak column. The purity of the distillate was checked by G.L.P.C. with both octoil and silver nitrate/glycol columns. The best part, amounting to 21% of the charge and containing less than 0.2% of impurities (methylenecyclohexane), was taken as standard material. B.p. 110.0° (760 mm); n_D^{20} 1.4502 (reported[2] 110.0°; 1.4503). The infrared spectrum in the 3–15 μ region agreed well with that given in the literature[10].

3-Methylcyclohexene. Cyclohexene was converted into 3-bromocyclohexene by the action of N-bromosuccinimide according to ZIEGLER[11]. The product was then treated with methylmagnesium iodide, in the conditions described by BERLANDE[12], to yield 3-methylcyclohexene. 35 ml of the olefin were purified by distillation on a Todd column equivalent to approximately 50 plates, at a reflux ratio of 40/1. The purity of the fractions was checked by G.L.P.C. on a silver nitrate/glycol column. 39% of purest material was obtained, containing less than 1% of impurities. B.p. 103.0–103.5° (760 mm); n_D^{20} 1.4447 (reported[2] 104.0°; 1.4444). The absorption in the 3–15 μ region was found to agree well with the infrared spectrum given in the literature[10].

4-Methylcyclohexene. 0.5 mole of pure commercial 4-methylcyclohexanol was purified by simple distillation and converted into the acetate by refluxing with 1.5 moles of acetic anhydride and 40 g of glacial acetic acid for 48 h. The acetate distilled on fractionation at 187° (760 mm). 4-Methylcyclohexene was obtained by pyrolysis[13] of this ester at 570° and about 30 sec contact time, using a pyrex tube of 25 mm diameter and 40 cm length, filled with pyrex beads. The yield of the crude olefin was approximately 90%. The product was fractionated on a Todd column as above, and 65% of pure product was obtained. The infrared spectrum of this cut agreed well with that given in the literature[10]. G.L.P.C. on a silver nitrate/glycol column showed that the purity of the material was at least 99%. B.p. 102.5° (760 mm); n_D^{20} 1.4419

References p. 512.

(reported[2] 102.7°; 1.4414). The difficulty of purifying this isomer and of determining its composition, is emphasized by the fact that commercially available "pure" 4-methylcyclohexene was found to contain 11% of the 3-methyl isomer, whereas a technical grade product, labelled "95% minimum" contained 30% of the 3-methyl compound. Elimination of the 3-methylcyclohexene by fractionation on a Hypercal Podbielniak column, equivalent to 100 theoretical plates, was not possible.

Methylenecyclohexane. Hexahydrobenzyl alcohol was prepared by the action of formaldehyde on cyclohexylmagnesium bromide[14] and then esterified with acetic anhydride. The acetate was pyrolysed in the same apparatus as above, at 50°, according to ARNOLD AND DOWDAL[15]. 36.5 ml of the resulting methylenecyclohexane were fractionated on a Todd columnn and 38% of pure material was obtained. The presence of the group $CH_2=C<$ was confirmed by a very strong absorption band at 889 cm^{-1} in the infrared spectrum[3]. G.L.P.C. on a silver nitrate/glycol column showed that the purity of the product was at least 99%. B.p. 103.5° (760 mm); n_D^{20} 1.4497 (reported[2] 103.3°; 1.4497).

SUMMARY

Smooth separation and quantitative analysis of mixtures of methylenecyclohexane and the three isomeric methylcyclohexenes can be accomplished by gas liquid partition chromatography on a column of 2 m length, with saturated silver nitrate/glycol as the stationary phase. The mean deviation of the results was found to be 0.6–0.7% of the total and the maximum deviation 1.2%.

REFERENCES

1 J. SHABTAI, *Ph. D. Dissertation*, The Hebrew University, Jerusalem, 1957.
2 S. W. FERRIS, *Handbook of Hydrocarbons*, Academic Press Inc., New York, 1955.
3 S. PINCHAS, J. SHABTAI AND E. GIL-AV, *Anal. Chem.*, in the press.
4 A. T. M. KEULEMANS, A. KWANTES AND P. ZAAL, *Anal. Chim. Acta.*, 13 (1955) 357.
5 B. W. BRADFORD, D. HARVEY AND D. E. CHALKLEY, *J. Inst. Petrol.*, 41 (1955) 80.
6 S. WINSTEIN AND H. J. LUCAS, *J. Am. Chem. Soc.*, 60 (1938) 836.
7 D. H. DESTY, *Vapour Phase Chromatography*, Butterworths Scientific Publications, London, 1957, p. 377.
8 D. H. DESTY, *Vapour Phase Chromatography*, Butterworths Scientific Publications, London, 1957, p. xi.
9 F. K. SIGNAIGO AND P. L. CRAMER, *J. Am. Chem. Soc.*, 55 (1933) 3326.
10 American Petroleum Institute, *Infrared Spectral Catalog*, Spectrograms Nos. 897–899, Contributed by the University of Minnesota, 1949.
11 K. ZIEGLER, A. SPÄTH, E. SCHAAF, W. SCHUMANN AND E. WINKELMANN, *Ann.*, 551 (1942) 80.
12 A. BERLANDE, *Bull. soc. chim. France*, [5] 9 (1942) 642.
13 A. J. VAN PELT, JR. AND J. P. WIBAUT, *Rec. trav. chim.*, 60 (1941) 55.
14 A. I. VOGEL, *Practical Organic Chemistry*, Longmans Green and Co., London, 1948, p. 252.
15 R. T. ARNOLD AND J. F. DOWDAL, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 (1948) 2590.

Received April 30th, 1958

OBSERVED AND CALCULATED R_F VALUES OF SEVERAL SYNTHETIC PEPTIDES IN PAPER CHROMATOGRAPHY*

THOMAS B. MOORE AND CARL G. BAKER**

Laboratory of Biochemistry, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Public Health Service, Department of Health, Education, and Welfare, Bethesda, Md. (U.S.A.)

The widespread use of paper chromatography in studies on peptides, particularly in protein-structure investigations, and the availability of large numbers of peptides in this Laboratory made it desirable to institute a systematic inquiry into the behavior of peptides in paper chromatography. In addition, data collected in such a study would supplement the extensive information on the properties of amino acids and peptides already obtained in this Laboratory[1-7].

The chromatographic behavior of 88 synthetic peptides and 29 amino acids was investigated in 15 solvent systems. For 9 of these solvent systems, comparisons were made between observed and calculated R_F values, the latter obtained by use of a method developed by PARDEE[8]. From considerations of free energy relationships of the peptides and amino acids in respective solvent systems, PARDEE derived the following equation:

$$RT \ln (1/R_F - 1)_p = (n - 1) A + B + \Sigma RT \ln (1/R_F - 1)_{AA} \quad (1)$$

where R is the molar gas constant (cal. per degree), T, the absolute temperature, n, the number of amino acid residues in the peptide, and A and B are constants. The subscripts P and AA refer to peptide and amino acid, respectively. The constants A and B are evaluated from a plot of $RT \ln (1/R_F - 1)_P - \Sigma RT \ln (1/R_F - 1)_{AA}$ *versus* the number of peptide bonds, $(n - 1)$, where A is the slope and B the intercept. For the determination of these constants, R_F values obtained in the 9 solvent systems for 33 dipeptides and 11 tripeptides were utilized.

EXPERIMENTAL

Compounds

The 88 peptides and 29 amino acids employed had theoretical elemental analyses, and the amino acids had optical rotation values in agreement with those in the literature[1,2,5-7].

Paper

Whatman No. 4 chromatographic paper was used for all determinations.

---

* Presented in preliminary form before the Division of Biological Chemistry, American Chemical Society, Cincinnati, Ohio, March 29–April 7, 1955. *Abstracts 127th National Meeting*, page 28c.

** Present address: Office of the Director, National Institutes of Health.

References p. 520.

TABLE I

COMPOSITION OF SOLVENT SYSTEMS[a]

Solvent (composition see below)	*A*	*B*	*C*	*D*	*E*	*F*	*G*	*H*	*I*	*J*	*K*	*L*	*M*	*N*	*O*
Distilled water	15	50	25	25		d	e	23	30	40	20		20	30	10
88% Formic acid	15														
Glacial acetic acid		10	10	5											
Methyl alcohol (abs.)													80		
Ethyl alcohol (abs.)								77		10					
n-Propyl alcohol									70						60
n-Butyl alcohol		40	65	12.5						50					
tert.-Butyl alcohol	70										40				
tert.-Amyl alcohol														35	
Methyl ethyl ketone											40				
Acetone												60			
Liquefied phenol[b]				25	c	d									
m-Cresol							e								
Pyridine													4	35	
0.5% Aqueous urea												40			
10% Trisodium citrate					c										
Conc. ammonium hydroxide															30
Reference	14	14	14	15	14	14	14	14	16	17	14	14	14	14	17
Phase[g]	M	U	M	U	U	U	U	M	M	M	M	M	M	M	M

A Formix
B 4:1:5 Butanol–acetic acid
C BuOH–acetic acid
D PBA
E Phenol (citrate)
F Phenol (H_2O) (NaCN and NH_3 atmos.)
G *m*-Cresol
H 77% Ethanol
I 70% Propanol
J BuOH–EtOH
K TBK[f]
L Acetone–urea
M Pyridine mix
N Pyridine–amyl alcohol
O Propanol–NH_3

[a] All reagent grade except *m*-cresol, which was practical grade.
[b] Mallinckrodt U.S.P. Gilt Label.
[c] Liquefied phenol saturated aqueous 10% trisodium citrate.
[d] Liquefied phenol saturated with water with addition of 4 to 6 crystals of sodium cyanide; a beaker of 0.3% NH_1OH present in the tank during each run.
[e] *m*-Cresol saturated with water; a beaker of 0.03% NH_4OH present in the tank during each run.
[f] A beaker of 5% aqueous diethylamine (Eastman No. 92) present in the tank during each run.
[g] M:miscible; U:upper layer used.

Solvent mixtures

Compositions of the 15 solvent mixtures employed are given in Table I.

The peptides and amino acids were dissolved in water at a 5 mmolar concentration, except where low solubility did not permit this concentration, in which case a saturated solution was used. The quantity of each solution applied to the paper was 0.01 ml, except for the sarcosyl peptide solutions where 0.05 ml was applied in 5 portions, with drying between each application. The solutions were spaced at 1-inch intervals along a line $1^1/_2$ inches from the bottom of 16 by 21 inch sheets of paper. Leucine and alanine were run on each sheet as standards.

Ascending chromatograms were run overnight in museum jars at room temperature[9]. The sheets were dried 20 to 30 min in warm air, dipped in a 0.25% solution of ninhydrin in acetone[10], and again dried in warm air to speed color development. After treatment with ninhydrin, most of the glycyl peptides first appeared as yellow spots which gradually turned to a blue-purple color within 10 to 20 min. The R_F values were determined at the middle of each spot with the aid of an elastic rule[11]. Each compound was run at least twice in each solvent mixture, and about 1/3 of them were run in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

The R_F values of the peptides and amino acids are shown in Table II.

The R_F values of the glycyl and diglycyl peptides of the aliphatic amino acids increase with increasing amino acid chain length in all of the solvent mixtures, as do those of the free amino acids. The alanyl peptides of this series show a similar increase.

The addition of one or more glycyl residues to a particular aliphatic amino acid has a variable effect on the R_F values. In solvent systems (B), (C) and (D), there is little change in the R_F values, but in solvents (A), (H) and (J) there is a decrease in the R_F values. In *phenol* (*citrate*) (E) the R_F value decreases as one glycyl residue is added, but increases when two glycyl residues are added. In the *phenol* solvent system (F), the R_F values generally increase when one or two glycyl residues are added to aliphatic amino acids.

Examination of groups of aliphatic compounds with equal numbers of carbon atoms reveals a decrease in R_F values for all solvent mixtures as the number of peptide bonds increases, but the location of the bond within the molecule has no effect on the migration rate. For example, the six-carbon dipeptides, glycyl-L-amino-*n*-butyric acid and alanylalanine, move slower than norleucine and faster than glycylglycylglycine, but there is no difference in R_F values for the two different dipeptides.

There is no significant difference in the R_F values for DL, L, and D stereoisomers except for the cystinylcystine peptides. L-Cystinyl-D-cystine has the same R_F value as D-cystinyl-L-cystine, but L-cystinyl-L-cystine moves much faster than the other two isomers in all 15 systems. Earlier work[12] indicates that the L-L isomer employed was the monomeric cyclo-L-cystinyl (monopeptide) and the L-D and D-L isomers the dimeric cystinyl-cystine (dipeptide).

References p. 520.

Table II. Experimental R_f Values of Peptides and Amino Acids

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
	Formix	Butanol-Acetic 4:1:5	BuOH:Acetic 6.7:1:2.5	PBA	Phenol (citrate)	Phenol (H_2O) (NaCN & NH_3 atmos.)	*m*-Cresol (NH_3 atmos.)	77% Ethanol	70% Propanol	BuOH: EtOH	TBK	Acetone-Urea	Pyridine Mix	Pyridine-Amyl	Propanol-NH_3
Glycylglycine	0.32	0.22	0.12	0.27	0.37	0.61	0.15	0.18	0.21	0.05	0.19	0.59	0.46	0.20	0.41
Cobalt complex of glycylglycine	0.04	0.04	0.02	0.06	0.23	0.32	0.02	0.24	0.21	0.00	0.06	0.68	0.52	0.19	0.26
Glycylsarcosine	0.42	0.17	0.11	0.41	0.68	0.80	0.44	0.33	0.30	0.05	0.18	0.73	0.49	0.21	0.43
DL-Alanylglycine	0.47	0.23	0.16	0.41	0.53	0.69	0.25	0.32	0.28	0.06	0.29	0.68	0.63	0.29	0.49
D-Alanylglycine	0.46	0.23	0.17	0.34	0.57	0.70	0.30	0.33	0.35	0.06	0.25	0.68	0.53	0.27	0.52
DL-Leucylglycine	0.75	0.54	0.53	0.66	0.68	0.86	0.56	0.61	0.63	0.23	0.60	0.83	0.75	0.59	0.74
L-γ-Glutamylglycine	0.35	0.15	0.12	0.23	0.18	0.32	0.04	0.16	0.18	0.02	0.05	0.63	0.52	0.16	0.25
Glycyl-DL-alanine	0.46	0.25	0.19	0.36	0.54	0.72	0.30	0.28	0.35	0.06	0.26	0.70	0.51	0.26	0.51
Glycyl-L-alanine	0.47	0.30	0.21	0.44	0.50	0.71	0.25	0.27	0.28	0.07	0.28	0.67	0.60	0.27	0.48
Glycyldehydroalanine	0.50	0.29	0.20	0.32	0.41	0.67	0.22	0.32	0.30	0.08	0.39	0.79	0.53	0.30	0.52
Cobalt complex of glycyldehydroalanine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.24	0.42	0.00	0.36	0.27	0.04	0.04	0.78	0.63	0.31	0.39
Sarcosyl-DL-alanine	0.53	0.25	0.13	0.55	0.83	0.82	–	0.41	0.35	0.05	0.30	0.68	0.59	0.21	0.54
Sarcosyldehydroalanine	0.63	0.35	0.27	0.55	0.81	0.82	0.50	0.41	0.40	0.12	0.48	0.86	0.64	0.36	0.68
DL-Alanyl-L-alanine	0.61	0.39	0.31	0.55	0.68	0.78	0.31	0.42	0.34	0.10	0.36	0.66	0.71	0.34	0.57
L-Alanyl-D-alanine	0.57	0.38	0.27	0.50	0.66	0.79	0.42	0.41	0.46	0.10	0.32	0.74	0.63	0.33	0.59
D-Alanyl-D-alanine	0.56	0.38	0.26	0.48	0.64	0.76	0.43	0.38	0.46	0.10	0.31	0.72	0.59	0.33	0.57
D-Alanyl-L-alanine	0.57	0.36	0.28	0.50	0.65	0.76	0.41	0.40	0.43	0.09	0.31	0.74	0.63	0.32	0.57
L-Alanyldehydroalanine	0.64	0.39	0.28	0.45	0.61	0.78	0.35	0.47	0.41	0.13	0.50	0.87	0.66	0.49	0.66
α-L-Glutamyl-L-alanine	0.53	0.25	0.25	0.39	0.32	0.48	0.03	0.24	0.10	0.04	0.08	0.63	0.54	0.16	0.28
γ-L-Glutamyl-β-alanine	0.40	0.20	0.19	0.38	0.33	0.42	0.04	0.22	0.21	0.03	0.05	0.66	0.58	0.20	0.28
Glycyl-L-serine	0.27	0.11	0.08	0.15	0.29	0.52	0.10	0.18	0.26	0.03	0.17	0.66	0.45	0.21	0.41
Glycyl-D-serine	0.27	0.18	0.08	0.16	0.29	0.54	0.10	0.19	0.25	0.03	0.17	0.61	0.43	0.22	0.41
Sarcosyl-α-amino-β-methylaminopropionic acid·HCl	0.21	0.10	0.05	0.40	0.74	0.89	0.82	0.22	0.21	0.04	0.18	0.29	0.27	0.22	0.48
Glycyl-α-aminoisobutyric acid	0.54	0.40	0.31	0.56	0.61	0.80	0.41	0.37	0.42	0.09	0.35	0.69	0.61	0.30	0.56
Glycyl-DL-α-amino-*n*-butyric acid	0.61	0.32	0.26	0.43	0.64	0.74	0.40	0.35	0.42	0.08	0.28	0.75	0.58	0.31	0.57
Glycyl-L-α-amino-*n*-butyric acid	0.56	0.39	0.30	0.51	0.62	0.82	0.38	0.41	0.44	0.10	0.34	0.74	0.66	0.32	0.58
L-Alanyl-L-α-amino-*n*-butyric acid	0.71	0.50	0.45	0.61	0.78	0.86	0.53	0.55	0.48	0.12	0.37	0.80	0.72	0.44	0.65
D-Alanyl-L-α-amino-*n*-butyric acid	0.69	0.45	0.42	0.56	0.72	0.82	0.52	0.51	0.50	0.15	0.37	0.74	0.65	0.41	0.64
Glycyl-L-threonine	0.35	0.24	0.12	0.20	0.41	0.66	0.16	0.24	0.32	0.04	0.21	0.71	0.50	0.26	0.48
Glycyl-D-valine	0.63	0.43	0.41	0.54	0.64	0.82	0.45	0.46	0.48	0.13	0.43	0.74	0.68	0.43	0.58
Glycyldehdrovaline	0.53	0.40	0.33	0.54	0.65	0.85	0.49	0.29	0.35	0.08	0.32	0.83	0.49	0.29	0.58
N-Dimethylglycyl-α-amino-β-dimethylaminopropionic acid	0.26	0.10	0.71	0.75	0.89	0.20	0.09	0.41	0.29	0.09	0.47	0.79	0.67	0.38	0.70
Glycyl-L-isovaline	0.61	0.49	0.41	0.57	0.68	0.84	0.50	0.47	0.48	0.13	0.45	0.78	0.64	0.38	0.64
Glycyl-D-isovaline	0.63	0.50	0.44	0.58	0.64	0.86	0.48	0.46	0.49	0.13	0.44	0.77	0.63	0.41	0.63
Glycyl-α,α-diethylglycine	0.72	0.61	0.50	0.63	0.76	0.85	0.59	0.50	0.53	0.18	0.52	0.87	0.70	0.54	0.70
Glycyl-D-norvaline	0.64	0.49	0.45	0.54	0.65	0.84	0.51	0.47	0.51	0.13	0.45	0.74	0.65	0.44	0.64
Glycyldehydronorvaline	0.58	0.46	0.43	0.54	0.65	0.84	0.49	0.36	0.39	0.10	0.40	0.85	0.57	0.36	0.60
L-Alanyl-L-norvaline	0.79	0.60	0.58	0.69	0.84	0.88	0.64	0.62	0.58	0.21	0.49	0.80	0.74	0.53	0.71
D-Alanyl-L-norvaline	0.77	0.57	0.52	0.63	0.76	0.86	0.61	0.56	0.60	0.21	0.48	0.84	0.69	0.50	0.71
Glycyl-DL-leucine	0.72	0.61	0.56	0.66	0.73	0.85	0.58	0.57	0.63	0.19	0.53	0.82	0.70	0.55	0.72
Glycyl-L-leucine	0.73	0.61	0.57	0.66	0.70	0.86	0.57	0.52	0.59	0.23	0.54	0.77	0.70	0.55	0.71
Glycyldehydroleucine	0.65	0.58	0.55	0.63	0.70	0.87	0.55	0.43	0.52	0.23	0.54	0.87	0.61	0.48	0.65
α-Glutamyl-L-leucine	0.70	0.64	0.60	0.65	0.52	0.63	0.20	0.68	0.66	0.19	0.20	0.80	0.73	0.35	0.50
Glycyl-DL-isoleucine	0.74	0.60	0.53	0.69	0.69	0.84	0.52	–	0.51	0.23	0.52	0.71	0.69	0.49	0.70
Glycyl-L-isoleucine	0.74	0.63	0.55	0.64	0.71	0.86	0.57	0.52	0.58	0.20	0.53	0.80	0.71	0.54	0.70
Glycyl-D-isoleucine	0.73	0.62	0.54	0.63	0.71	0.87	0.55	0.53	0.58	0.20	0.52	0.81	0.69	0.54	0.69
Glycyl-L-alloisoleucine	0.71	0.59	0.54	0.63	0.72	0.83	0.56	0.53	0.57	0.20	0.54	0.79	0.70	0.52	0.71
Glycyldehydroisoleucine	0.64	0.51	0.49	0.62	0.69	0.88	0.60	0.34	0.44	0.14	0.42	0.84	0.51	0.37	0.59
Glycyl-L-norleucine	0.72	0.65	0.58	0.65	0.73	0.86	0.60	0.57	0.63	0.21	0.58	0.83	0.69	0.57	0.74
Glycyl-D-norleucine	0.72	0.61	0.54	0.64	0.73	0.84	0.58	0.57	0.63	0.20	0.57	0.83	0.70	0.57	0.74
Glycyl-DL-α-amino-*n*-caprylic acid	0.86	0.71	0.63	0.70	0.77	0.89	0.65	0.59	0.74	0.40	0.66	0.90	0.71	0.65	0.81
Glycyldehydrophenylalanine	0.59	0.52	0.43	0.58	0.67	0.85	0.54	0.36	0.52	0.24	0.56	0.89	0.55	0.55	0.70
Sarcosyl-DL-phenylalanine	0.70	0.50	0.42	0.74	0.80	0.81	0.77	0.52	0.57	0.22	0.53	0.80	0.67	0.60	0.64
Sarcosyldehydrophenylalanine	0.66	0.55	0.47	0.75	0.85	0.85	0.49	0.50	0.52	0.42	0.62	0.81	0.63	0.49	0.70
Sarcosyl-N-methylglycyldehydrophenylalanine	0.76	0.59	0.39	0.78	0.90	0.92	0.75	0.48	0.57	0.31	0.59	0.88	0.67	0.64	0.78
DL-Alanyl-DL-phenylalanine	0.76	0.62	0.55	0.72	0.76	0.87	0.62	0.52	0.59	0.30	0.56	0.83	0.72	0.60	0.75
α-L-Glutamyl-L-phenylalanine	0.73	0.62	0.56	0.62	0.51	0.64	0.18	0.35	0.31	0.09	0.20	0.84	0.68	0.37	0.43

(continued)

Table II. Experimental R_f Values of Peptides and Amino Acids (continued)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
	Formix	Butanol-Acetic 4:1:5	BuOH:Acetic 6.7:1:2.5	PBA	Phenol (citrate)	Phenol (H_2O) (NaCN & NH_3 atmos.)	*m*-Cresol (NH_3 atmos.)	77% Ethanol	70% Propanol	BuOH: EtOH	TBK	Acetone-Urea	Pyridine Mix	Pyridine-Amyl	Propanol-NH_3
L-Cystinyl-L-cystine	0.38	0.32	0.21	0.35	0.46	0.68	0.20	0.34	0.38	0.18	0.42	0.75	0.53	0.43	0.56
L-Cystinyl-D-cystine	0.08	0.11	0.03	0.17	0.08	0.37	0.02	0.02	0.12	0.02	0.08	0.30	0.18	0.09	0.30
D-Cystinyl-L-cystine	0.08	0.10	0.03	0.15	0.16	0.34	0.02	0.00	0.11	0.01	0.15	0.41	0.22	0.09	0.31
Glycyl-D-methionine	0.64	0.41	0.31	0.49	0.71	0.81	0.45	0.38	0.47	0.12	0.41	0.80	0.59	0.46	0.64
Glycyl-DL-tryptophan	0.60	0.53	0.41	0.52	0.73	0.86	0.49	0.35	0.51	0.14	0.50	0.82	0.56	0.56	0.64
Glycyl-L-tryptophan	0.57	0.52	0.42	0.62	0.68	0.83	0.47	0.34	0.43	0.19	0.51	0.73	0.59	0.57	0.65
Glycyl-D-tryptophan	0.60	0.49	0.41	–	0.73	0.82	0.51	0.35	0.50	0.15	0.50	0.81	0.55	0.54	0.64
α-L-Aspartyl-D-histidine	0.12	0.07	0.04	0.24	0.38	0.45	0.05	0.04	0.08	0.01	0.06	0.41	0.27	0.12	0.23
Glycyl-L-lysine · H_2SO_4	0.12	0.05	0.07	0.13	0.35	0.83	0.51	0.07	0.08	0.02	0.13	0.39	0.14	0.09	0.41
Glycyl-L-aspartic acid	0.16	0.12	0.05	0.14	0.35	0.56	0.11	0.12	0.23	0.05	0.12	0.60	0.32	0.18	0.33
Glycyl-L-glutamic acid	0.34	0.31	0.11	0.18	0.17	0.29	0.03	0.14	0.20	0.03	0.07	0.62	0.43	0.14	0.24
α-L-Glutamyl-L-glutamic acid	0.41	0.25	0.21	0.24	0.07	0.10	0.00	0.15	0.17	0.02	0.03	0.63	0.50	0.08	0.18
Glycyl-D-tyrosine	0.50	0.41	0.32	0.41	0.56	0.74	0.27	0.37	0.44	0.09	0.36	0.81	0.59	0.53	0.52
Glycylglycylglycine	0.24	0.15	0.09	0.22	0.44	0.72	0.22	0.18	0.26	0.03	0.21	0.69	0.40	0.21	0.34
D-Alanylglycylglycine	0.39	0.20	0.13	0.33	0.62	0.79	0.34	0.28	0.35	0.03	0.27	0.76	0.54	0.30	0.45
DL-Leucylglycylglycine	0.65	0.50	0.44	0.67	0.82	0.85	0.60	0.59	0.59	0.16	0.54	0.87	0.74	0.57	0.72
D-Leucylglycylglycine	0.66	0.49	0.42	0.66	0.79	0.88	0.57	0.59	0.58	0.16	0.53	0.87	0.74	0.58	0.71
Glycyl-DL-alanylglycine	0.35	0.23	0.13	0.36	0.59	0.79	0.33	0.28	0.36	0.04	0.23	0.73	0.52	0.30	0.47
Glycyl-D-alanylglycine	0.35	0.24	0.13	0.36	0.56	0.77	0.33	0.28	0.36	0.04	0.22	0.74	0.52	0.29	0.48
Glycyl-DL-leucylglycine	0.65	0.58	0.47	0.63	0.75	0.88	0.61	0.57	0.60	0.17	0.55	0.85	0.72	0.56	0.73
Glycyl-DL-phenylalanylglycine	0.63	0.47	0.38	0.61	0.76	0.84	0.59	0.44	0.54	0.14	0.49	0.85	0.65	0.59	0.66
Glycylglycyl-DL-alanine	0.37	0.25	0.15	0.38	0.61	0.81	0.34	0.29	0.34	0.04	0.26	0.74	0.52	0.29	0.47
Glycylglycyl-L-alanine	0.38	0.22	0.15	0.38	0.61	0.80	0.37	0.28	0.31	0.05	0.27	0.70	0.52	0.28	0.46
Glycylsarcosyldehydroalanine	0.51	0.32	0.23	0.58	0.74	0.85	0.50	0.38	0.34	0.09	0.32	0.80	0.56	0.39	0.55
Glycylglycyl-DL-leucine	0.65	0.54	0.47	0.66	0.82	0.86	0.67	0.55	0.58	0.16	0.51	0.86	0.72	0.51	0.68
Glycylglycyl-DL-phenylalanine	0.65	0.49	0.41	0.53	0.82	0.88	0.58	0.42	0.51	0.11	0.50	0.85	0.65	0.54	0.64
Glycylglycyldehydrophenylalanine	0.51	0.46	0.35	0.58	0.73	0.91	0.36	0.35	0.42	0.09	0.36	0.86	0.54	0.44	0.60
Glycylglycyl-L-cystine	0.07	0.08	0.07	0.09	0.19	0.52	0.05	0.04	0.15	0.01	0.05	0.51	0.15	0.10	0.22
DL-Alanyl-DL-alanyl-L-cystine	0.16	0.08	0.08	0.16	0.33	0.65	0.09	0.09	0.13	0.01	0.09	0.57	0.29	0.16	0.34
Glycylglycylglycine	0.18	0.12	0.06	0.22	0.58	0.75	0.24	0.17	0.24	0.02	0.16	0.64	0.37	0.21	0.32
Glycylglycylglycylglycylglycine	0.12	0.08	0.05	0.25	0.66	0.71	0.22	0.16	0.24	0.02	0.12	–	0.35	0.21	0.30
Glycine	0.41	0.17	0.13	0.22	0.40	0.50	0.14	0.30	0.29	0.08	0.17	0.54	0.41	0.24	0.38
Sarcosine	0.47	0.18	0.09	0.52	0.77	0.77	0.52	0.42	0.35	0.15	0.25	0.69	0.56	0.36	0.56
Alanine	0.51	0.28	0.20	0.39	0.56	0.60	0.28	0.40	0.36	0.13	0.24	0.66	0.59	0.36	0.50
α-Amino-n-butyric acid	0.69	0.34	0.30	0.48	0.71	0.75	0.47	0.51	0.46	0.18	0.29	0.68	0.65	0.41	0.54
Norvaline	0.80	0.49	0.44	0.62	0.79	0.81	0.60	0.61	0.60	0.29	0.39	0.74	0.71	0.51	0.64
δ-Aminovaleric acid	0.65	0.46	0.35	0.62	0.81	0.81	0.59	0.48	0.38	0.11	0.20	0.62	0.63	0.28	0.47
Norleucine	0.87	0.63	0.58	0.70	0.83	0.85	0.71	0.67	0.74	0.43	0.52	0.80	0.75	0.61	0.72
α-Amino-n-heptylic acid	0.90	0.71	0.68	0.77	0.85	0.88	0.77	0.70	0.83	0.54	0.62	0.85	0.77	0.68	0.83
α-Amino-n-caprylic acid	0.94	0.77	0.76	0.80	0.87	0.88	0.84	0.75	0.87	0.59	0.71	0.91	0.80	0.73	0.87
Valine	0.73	0.45	0.37	0.58	0.75	0.78	0.57	0.58	0.60	0.24	0.38	0.74	0.73	0.46	0.67
Leucine	0.78	0.61	0.59	0.70	0.78	0.82	0.67	0.61	0.61	0.41	0.51	0.78	0.75	0.61	0.74
Isoleucine	0.82	0.59	0.52	0.68	0.81	0.85	0.68	0.64	0.68	0.37	0.47	0.80	0.77	0.56	0.73
Serine	0.37	0.16	0.12	0.19	0.32	0.45	0.10	0.32	0.29	0.08	0.28	0.60	0.44	0.28	0.39
Threonine	0.44	0.17	0.15	0.26	0.48	0.54	0.21	0.42	0.38	0.13	0.48	0.71	0.58	0.38	0.47
Phenylalanine	0.76	0.53	0.49	0.68	0.84	0.85	0.72	0.57	0.61	0.34	0.54	0.77	0.69	0.63	0.73
Tyrosine	0.59	0.24	0.30	0.35	0.59	0.64	0.31	0.45	0.44	0.24	0.34	0.79	0.61	0.59	0.56
Diiodotyrosine	0.68	0.62	0.59	0.67	0.76	0.63	0.36	0.51	0.50	0.34	0.31	0.77	0.64	0.66	0.42
Tryptophan	0.59	0.43	0.35	0.50	0.70	0.75	0.53	0.39	0.46	0.17	0.51	0.65	0.47	0.55	0.64
Proline	0.58	0.27	0.23	0.65	0.88	0.84	0.75	0.49	0.42	0.13	0.25	0.69	0.62	0.37	0.53
Hydroxyproline	0.39	0.17	0.13	0.36	0.66	0.68	0.42	0.40	0.33	0.08	0.18	0.61	0.52	0.32	0.42
Histidine	0.16	0.10	0.08	0.37	0.61	0.72	0.42	0.17	0.23	0.13	0.22	0.51	0.38	0.27	0.43
Arginine	0.25	0.10	0.08	0.34	0.59	0.93	0.61	0.12	0.19	0.05	0.05	0.18	0.17	0.17	0.36
Ornithine	0.16	0.09	0.07	0.21	0.37	0.76	0.40	0.14	0.13	0.04	0.09	0.18	0.13	0.15	0.32
Lysine	0.22	0.08	0.06	0.25	0.54	0.87	0.46	0.12	0.16	0.03	0.10	0.19	0.20	0.14	0.36
Aspartic acid	0.31	0.16	0.09	0.10	0.08	0.19	0.00	0.20	0.13	0.02	0.05	0.53	0.44	0.13	0.19
Glutamic acid	0.42	0.17	0.17	0.24	0.14	0.26	0.03	0.22	0.20	0.03	0.05	0.64	0.54	0.17	0.25
Methionine	0.69	0.44	0.36	0.57	0.77	0.82	0.59	0.56	0.51	0.25	0.39	0.73	0.68	0.52	0.65
Cysteine · HCl	0.07	0.08	0.03	0.08	0.25	0.32	0.06	0.12	0.13	0.02	0.05	0.31	0.22	0.12	0.25
Cystine	0.07	0.05	0.03	0.06	0.18	0.39	0.05	0.11	0.11	0.00	0.05	0.30	0.30	0.11	0.19

Table III. Comparison of Observed and Calculated R_f Values of Peptides

Peptide	A*			B*			E*			F*			G*			H*			K*			M*			O*		
	Obs.	Theory	Δ	Obs.	Theory	Δ	Obs.	Theory	Δ	Obs.	Theory	Δ	Obs.	Theory	Δ	Obs.	Theory	Δ	Obs.	Theory	Δ	Obs.	Theory	Δ	Obs.	Theory	Δ
Glycylglycine	0.32	0.37	0.05	0.22	0.20	-0.02	0.37	0.37	0.00	0.61	0.56	-0.05	0.15	0.11	-0.04	0.18	0.22	0.04	0.19	0.20	0.01	0.46	0.34	-0.12	0.41	0.38	-0.03
Glycylsarosine	0.42	0.43	0.01	0.17	0.21	0.04	0.68	0.75	0.07	0.80	0.81	0.01	0.44	0.44	0.00	0.33	0.33	0.00	0.18	0.29	0.11	0.52	0.49	-0.03	0.43	0.56	0.13
Alanylglycine	0.47	0.47	0.00	0.23	0.32	0.09	0.55	0.53	-0.02	0.70	0.66	-0.04	0.28	0.22	-0.06	0.33	0.31	-0.02	0.27	0.28	0.01	0.58	0.48	-0.10	0.51	0.50	0.01
Leucylglycine	0.75	0.75	0.00	0.54	0.65	0.11	0.68	0.76	0.08	0.86	0.85	-0.01	0.56	0.59	0.03	0.61	0.51	-0.10	0.60	0.56	-0.04	0.75	0.69	-0.06	0.74	0.74	0.00
Glycylalanine	0.47	0.47	0.00	0.28	0.32	0.04	0.52	0.53	0.01	0.72	0.66	-0.06	0.28	0.22	-0.06	0.28	0.31	0.03	0.27	0.28	0.01	0.56	0.48	-0.08	0.50	0.50	0.00
Sarcosylalanine	0.53	0.53	0.00	0.25	0.33	0.08	0.83	0.85	0.02	0.82	0.87	0.05	–	–	–	0.41	0.43	0.02	0.30	0.39	0.09	0.59	0.67	0.08	0.54	0.68	0.14
Alanylalanine	0.58	0.57	-0.01	0.38	0.47	0.09	0.66	0.68	0.02	0.77	0.74	-0.03	0.39	0.40	0.01	0.40	0.41	0.01	0.33	0.37	0.04	0.64	0.69	0.05	0.58	0.62	0.04
α-Glutamylalanine	0.53	0.48	-0.05	0.25	0.32	0.07	0.32	0.22	0.10	0.48	0.40	-0.08	0.03	0.05	0.02	0.24	0.23	-0.01	0.08	0.09	0.01	0.54	0.65	0.09	0.28	0.35	0.07
Glycylserine	0.27	0.34	0.07	0.15	0.19	0.04	0.29	0.29	0.00	0.53	0.51	-0.02	0.10	0.07	-0.03	0.19	0.24	0.05	0.17	0.32	0.15	0.44	0.37	-0.07	0.41	0.39	-0.02
Glycyl-α-amino-n-butyric acid	0.59	0.66	0.07	0.36	0.38	0.02	0.63	0.69	0.06	0.78	0.79	0.01	0.39	0.39	0.00	0.53	0.41	-0.11	0.31	0.33	0.02	0.62	0.58	-0.04	0.58	0.54	-0.04
Alanyl-α-amino-n-butyric acid	0.70	0.74	0.04	0.48	0.54	0.06	0.75	0.81	0.06	0.84	0.85	0.01	0.53	0.60	0.07	0.53	0.52	-0.01	0.37	0.44	0.07	0.69	0.74	0.05	0.65	0.66	0.01
Glycylthreonine	0.35	0.40	0.05	0.24	0.20	-0.04	0.41	0.45	0.04	0.66	0.60	-0.06	0.16	0.16	0.00	0.24	0.33	0.09	0.21	0.53	0.32	0.50	0.51	0.01	0.48	0.47	-0.01
Glycylvaline	0.63	0.70	0.07	0.43	0.49	0.06	0.64	0.73	0.09	0.82	0.82	0.00	0.45	0.49	0.04	0.46	0.48	0.02	0.43	0.43	0.00	0.68	0.67	-0.01	0.58	0.67	0.09
Glycylnorvaline	0.64	0.77	0.13	0.49	0.53	0.04	0.65	0.77	0.12	0.84	0.84	0.00	0.51	0.52	0.01	0.47	0.51	0.04	0.45	0.44	-0.01	0.65	0.65	0.00	0.64	0.64	0.00
Alanylnorvaline	0.78	0.84	0.06	0.59	0.69	0.10	0.80	0.80	0.00	0.87	0.89	0.02	0.63	0.72	0.09	0.59	0.62	0.03	0.49	0.55	0.06	0.72	0.79	0.07	0.71	0.74	0.03
Glycylleucine	0.73	0.75	0.02	0.61	0.65	0.04	0.72	0.76	0.04	0.86	0.85	-0.01	0.58	0.59	0.01	0.55	0.51	-0.04	0.54	0.56	0.02	0.70	0.69	-0.01	0.72	0.74	0.02
α-Glutamylleucine	0.70	0.76	0.06	0.64	0.65	0.01	0.52	0.43	-0.09	0.63	0.67	0.04	0.20	0.22	0.02	0.68	0.41	-0.27	0.20	0.25	0.05	0.73	0.79	0.06	0.50	0.61	0.11
Glycylisoleucine	0.74	0.80	0.06	0.62	0.63	0.01	0.70	0.79	0.09	0.86	0.86	0.00	0.55	0.61	0.06	0.50	0.55	0.05	0.52	0.52	0.00	0.70	0.72	0.02	0.70	0.73	0.03
Glycylnorleucine	0.72	0.85	0.13	0.63	0.67	0.04	0.73	0.81	0.08	0.85	0.88	0.03	0.59	0.64	0.05	0.57	0.58	0.01	0.58	0.57	-0.01	0.70	0.69	-0.01	0.74	0.72	-0.02
Glycyl-α-amino-n-caprylic acid	0.86	0.93	0.07	0.71	0.80	0.09	0.77	0.86	0.09	0.89	0.90	0.01	0.65	0.79	0.14	0.59	0.67	0.08	0.66	0.75	0.09	0.71	0.75	0.04	0.81	0.87	0.06
Sarcosylphenylalanine	0.66	0.78	0.12	0.50	0.59	0.09	0.80	0.96	0.16	0.81	0.96	0.15	0.77	0.93	0.16	0.52	0.60	0.08	0.53	0.70	0.17	0.67	0.75	0.08	0.64	0.85	0.21
Alanylphenylalanine	0.76	0.80	0.04	0.62	0.72	0.10	0.76	0.90	0.14	0.87	0.92	0.05	0.62	0.82	0.20	0.52	0.58	0.06	0.56	0.69	0.13	0.72	0.78	0.06	0.75	0.81	0.06
α-Glutamylphenylalanine	0.73	0.74	0.01	0.62	0.57	-0.05	0.51	0.53	0.02	0.64	0.72	0.08	0.18	0.26	0.06	0.35	0.37	0.02	0.20	0.27	0.07	0.68	0.74	0.06	0.43	0.59	0.16
L-Cystinyl-L-cystine	0.38	0.01	-0.37	0.32	0.02	-0.30	0.46	0.06	-0.40	0.68	0.34	-0.32	0.20	0.01	-0.19	0.34	0.02	-0.32	0.42	0.14	-0.28	0.53	0.17	-0.36	0.56	0.08	-0.48
L-Cystinyl-D-cystine	0.08	0.01	-0.07	0.11	0.02	-0.09	0.12	0.06	-0.06	0.36	0.34	-0.02	0.02	0.01	-0.01	0.01	0.02	0.01	0.12	0.14	0.02	0.20	0.17	-0.03	0.31	0.08	-0.23
Glycylmethionine	0.64	0.66	0.02	0.41	0.48	0.07	0.71	0.75	0.04	0.81	0.85	0.04	0.45	0.51	0.06	0.38	0.46	0.08	0.41	0.44	0.03	0.59	0.62	0.03	0.64	0.65	0.01
Glycyltryptophan	0.59	0.55	-0.04	0.51	0.47	-0.04	0.71	0.67	-0.04	0.84	0.79	-0.05	0.49	0.45	-0.04	0.35	0.30	-0.05	0.50	0.56	0.06	0.57	0.40	-0.17	0.64	0.64	0.00
α-Aspartylhistidine	0.12	0.10	-0.02	0.07	0.11	0.04	0.38	0.15	-0.13	0.45	0.44	-0.01	0.05	–	–	0.04	0.08	0.04	0.06	0.08	0.02	0.27	0.34	0.07	0.23	0.23	0.00
Glycyllysine· H_2SO_4	0.12	0.20	0.08	0.05	0.09	0.04	0.35	0.51	0.16	0.83	0.90	0.07	0.51	0.38	-0.13	0.07	0.08	0.01	0.13	0.12	-0.01	0.14	0.16	0.02	0.41	0.36	-0.05
Glycylaspartic acid	0.16	0.28	0.12	0.12	0.19	0.07	0.35	0.07	-0.28	0.56	0.23	-0.33	0.11	–	–	0.12	0.14	0.02	0.12	0.06	-0.06	0.32	0.37	0.05	0.33	0.19	-0.14
Glycylglutamic acid	0.34	0.38	0.04	0.31	0.20	-0.11	0.17	0.13	-0.04	0.29	0.31	0.02	0.03	0.02	-0.01	0.14	0.16	0.02	0.07	0.06	-0.01	0.43	0.47	0.04	0.24	0.25	0.01
α-Glutamylglutamic acid	0.41	0.39	-0.02	0.25	0.20	-0.05	0.07	0.03	-0.04	0.10	0.14	0.04	0.00	–	–	0.15	0.11	-0.04	0.03	0.14	0.11	0.50	0.60	0.10	0.18	0.15	-0.03
Glycyltyrosine	0.50	0.55	0.05	0.41	0.27	-0.14	0.56	0.56	0.00	0.74	0.69	-0.05	0.27	0.25	-0.02	0.37	0.36	-0.01	0.36	0.39	0.03	0.59	0.54	-0.05	0.52	0.56	0.04
Glycylglycylglycine	0.24	0.30	0.06	0.15	0.14	-0.01	0.44	0.40	-0.04	0.72	0.63	-0.09	0.22	0.12	-0.10	0.18	0.21	0.03	0.21	0.17	-0.04	0.40	0.25	-0.15	0.34	0.34	0.00
Alanylglycylglycine	0.39	0.39	0.00	0.20	0.24	0.04	0.62	0.56	-0.06	0.79	0.72	-0.07	0.34	0.25	-0.09	0.28	0.29	0.01	0.27	0.24	-0.03	0.54	0.50	-0.04	0.45	0.46	0.01
Leucylglycylglycine	0.66	0.69	0.03	0.50	0.55	0.05	0.81	0.78	-0.03	0.87	0.89	0.02	0.59	0.64	0.05	0.59	0.49	-0.10	0.54	0.51	-0.03	0.74	0.68	-0.06	0.72	0.71	-0.01
Glycylalanylglycine	0.35	0.39	0.04	0.24	0.24	0.00	0.58	0.56	-0.02	0.78	0.72	-0.06	0.33	0.25	-0.08	0.28	0.29	0.01	0.23	0.24	0.01	0.52	0.50	-0.02	0.48	0.46	-0.02
Glycylleucylglycine	0.65	0.69	0.04	0.58	0.55	-0.03	0.75	0.78	0.03	0.88	0.89	0.01	0.61	0.64	0.03	0.57	0.49	-0.08	0.55	0.51	-0.04	0.72	0.68	-0.04	0.73	0.71	-0.02
Glycylphenylalanylglycine	0.63	0.66	0.03	0.47	0.47	0.00	0.76	0.84	0.08	0.84	0.91	0.07	0.59	0.69	0.10	0.44	0.45	0.01	0.49	0.54	0.05	0.65	0.61	-0.04	0.66	0.70	0.04
Glycylglycylalanine	0.38	0.39	0.01	0.24	0.24	0.00	0.61	0.56	-0.05	0.81	0.72	-0.09	0.36	0.25	-0.11	0.29	0.29	0.00	0.27	0.24	-0.03	0.52	0.50	-0.02	0.47	0.46	-0.01
Glycylglycylleucine	0.65	0.69	0.04	0.54	0.55	0.01	0.82	0.78	-0.04	0.86	0.89	0.03	0.67	0.64	-0.03	0.55	0.49	0.06	0.51	0.51	0.00	0.72	0.68	-0.04	0.68	0.71	0.03
Glycylglycylphenylalanine	0.65	0.66	0.01	0.49	0.47	-0.02	0.82	0.84	0.02	0.88	0.91	0.03	0.58	0.69	0.11	0.42	0.45	0.03	0.50	0.54	0.04	0.65	0.61	-0.04	0.64	0.70	0.06
Glycylglycylcystine	0.07	0.04	-0.03	0.08	0.04	-0.04	0.19	0.18	-0.01	0.52	0.53	0.01	0.05	0.04	-0.01	0.04	0.07	0.03	0.05	0.05	0.00	0.15	0.23	0.08	0.22	0.16	-0.06
Alanylalanylcystine	0.16	0.09	-0.07	0.08	0.13	0.05	0.33	0.45	0.12	0.65	0.71	0.06	0.09	0.21	0.12	0.09	0.16	0.07	0.09	0.11	0.02	0.29	0.56	0.27	0.34	0.35	0.01
Glycylglycylglycylglycylglycine	0.18	0.23	0.05	0.12	0.10	-0.02	0.58	0.44	-0.14	0.75	0.70	-0.05	0.24	0.15	-0.09	0.17	0.20	0.03	0.16	0.15	-0.01	0.37	0.31	0.06	0.32	0.31	-0.01
Glycylglycylglycylglycylglycyl-glycine	0.12	0.18	0.06	0.08	0.07	-0.01	0.66	0.47	-0.19	0.71	0.75	0.04	0.22	0.17	-0.05	0.16	0.19	0.03	0.12	0.13	0.01	0.35	0.23	-0.12	0.30	0.27	-0.03

*See Table I. for solvent mixtures designated in table by capital letters

No difference in R_F values was noted for groups of peptides in which the sequence of amino acids was altered. For example, alanylglycine migrates at the same rate as glycylalanine, and leucylglycine the same as glycylleucine. The tripeptides, alanylglycylglycine, glycylalanylglycine, and glycylglycylalanine, all have identical R_F values.

Comparison of the R_F values for a peptide with those for the constituent amino acids shows no regular pattern. In some systems a dipeptide has R_F values intermediate between those of the amino acids, but in other solvents the peptide migrates faster or slower than either amino acid. If a peptide is composed of a small amino acid such as glycine and a much larger one, such as leucine, phenylalanine, methionine, or glutamic acid, the R_F values of the peptide correspond more closely to those of the larger amino acid in most of the solvents.

TABLE IV

VALUES OF CONSTANTS A AND B IN EQUATION (1)

Solvent mixture	*A* *Cal/mole*	*B* *Cal/mole*
A. Formix	—14.0	—112.6
B. Butanol–acetic acid (4:1:5)	—695.9	—349.7
E. Phenol (citrate)	—322.8	157.4
F. Phenol–(H_2O) (NaCN and NH_3 atmos.)	—172.5	27.8
G. *m*-Cresol	—1187.2	303.6
H. 77% Ethanol	—456.2	187.2
K. TBK	—828.4	—232.9
M. Pyridine mix	—172.3	125.0
O. Propanol–NH_3	—190.5	—103.4

In Table III the observed R_F values in 9 solvents are listed with the theoretical values (Eqn. 1) and the differences between the two for each of the 46 peptides included in the theoretical calculations. For the great majority of these compounds, the difference between the two R_F values is less than $\pm$ 0.05. The only peptide which consistently varies by a wide margin from the calculated value is L-cystinyl-L-cystine. Calculated values for L-cystinyl-L-cystine are useless in this study since the compound employed was a cyclic monopeptide with only a single cystine residue[12] and PARDEE's formula[8] is inapplicable. Other peptides that occasionally vary by more than 0.10 from the calculated values usually contain sarcosine, glutamic acid, aspartic acid, lysine, or phenylalanine.

The values employed for the constants A and B in Eqn. (1) are listed in Table IV. Even though the tetra- and pentapeptides were not included in the evaluation of the constants, their theoretical R_F values calculated with constants A and B are in close agreement with the observed values except in one solvent system, *phenol* (*citrate*) (E), where the differences exceeded 0.10. More data on the behavior of peptides of greater chain length are needed to test the usefulness of Eqn. (1) for predicting R_F values of longer peptides.

The standard errors of the mean of 10 to 15 determinations of the R_F values for leucine and for alanine were calculated for each of the 15 solvent systems. The *acetone–*

References p. 520.

urea (L) solvent mixture had the highest standard error of 0.016, and 77% *ethanol* (H), *Formix* (A), *TBK* (K), and *BuOH–acetic* (C) had standard errors from 0.011 to 0.014. The other systems had standard errors of 0.006 to 0.010.

The solvent mixtures which appear to be better ones on the basis of compactness and color intensity of the spots, rapidity of solvent migration, and separation of the various amino acids are: *Formix* (A), *phenol* (*citrate*) (E), 77% *ethanol* (H), 70% *propanol* (I), *TBK* (K), *pyridine mix* (M), *pyridine–amyl alcohol* (N), and *propanol–NH_3* (O).

The R_F values on which PARDEE based his calculations[8] were taken from KNIGHT[13]. The solvents used by KNIGHT are not the same as used here, although his phenol–water system is similar to the *phenol* (*citrate*) (E) used here. Eleven of the peptides reported by KNIGHT are included in this study, and when results with KNIGHT'S phenol–water system are compared with those obtained with solvent system (E), the R_F values for nine of these are within 0.05 of those reported in this paper. General review of the literature revealed few instances where the conditions employed were the same as those in this study, but in the few cases in which they were, agreement in results was noted.

ACKNOWLEDGEMENT

The 6 glutamyl peptides were kindly donated by Drs. A. MEISTER and T. T. OTANI and the 29 amino acids and other 82 peptides by Dr. J. P. GREENSTEIN of the Laboratory of Biochemistry, National Cancer Institute.

SUMMARY

To supplement extensive information on peptides and amino acids, data were obtained on the paper-chromatographic behavior of 88 synthetic peptides and 29 amino acids in 15 solvent systems. Theoretical R_F values were calculated for 46 peptides in 9 solvent systems and were found to be in good agreement with the observed values.

REFERENCES

1 J. P. GREENSTEIN, *Advances in Protein Chem.*, 9 (1954) 121.
2 J. P. GREENSTEIN, S. M. BIRNBAUM AND M. C. OTEY, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 307.
3 R. J. KOEGEL, R. A. MCCALLUM, J. P. GREENSTEIN, M. WINITZ AND S. M. BIRNBAUM, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 69 (1957) 94.
4 A. MEISTER, L. LEVINTOW, R. B. KINGSLEY AND J. P. GREENSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 535.
5 K. R. RAO, S. M. BIRNBAUM AND J. P. GREENSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 203 (1953) 1.
6 K. R. RAO, S. M. BIRNBAUM, R. B. KINGSLEY AND J. P. GREENSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 198 (1952) 507.
7 D. S. ROBINSON, S. M. BIRNBAUM AND J. P. GREENSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 202 (1953) 1.
8 A. B. PARDEE, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 757.
9 R. J. WILLIAMS AND H. KIRBY, *Science*, 107 (1948) 481.
10 G. TOENNIES AND J. J. KOLB, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 823.
11 D. M. P. PHILLIPS, *Nature*, 162 (1948) 29.
12 R. WADE, M. WINITZ AND J. P. GREENSTEIN, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 373.
13 C. A. KNIGHT, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 753.
14 R. J. BLOCK, E. L. DURRUM AND G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press, Inc., New York, 1955.
15 W. GRASSMANN AND G. DEFFNER, *Z. physiol. Chem.*, 293 (1953) 89.
16 J. C. UNDERWOOD AND L. B. ROCKLAND, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 1553.
17 A. MEISTER, *J. Biol. Chem.*, 210 (1954) 17.

Received April 19th, 1958

A NOTE ON THE CALCULATION OF THE ZONE MOBILITIES OF PEPTIDES FROM THEIR DIFFUSION COEFFICIENTS

J. T. EDWARD AND R. CRAWFORD
Chemical Laboratory, Trinity College, Dublin (Ireland)

Studies of paper electrophoresis[1] have shown that the zone mobilities u_z of monovalent ammon um ions in a background solution of aqueous acetic acid are given with fair accuracy by the equation

$$u_z = u_o \varrho \eta_o / \eta_a \qquad (1)$$

where u_o is the mobility of the ion in infinitely dilute aqueous solution, η_o and η_a are the viscosities of water and of the aqueous acetic acid solution respectively, and ϱ is an "obstructive factor" characteristic of the paper strip[2,3]. The viscosities at 25° are available in the literature[4], and the obstructive factor may be estimated in various ways[2,3], and tends to a constant value for a given type of paper when the experimental procedure is standardized[1,2]. Hence the possibility of calculating u_z from equation (1) depends on the possibility of calculating u_o. For a relatively small number of ions the equivalent conductances are available from which u_o may be calculated. For the other ions, u_o may in favorable cases be calculated from their volumes, shapes and charges[5]. However, it is sometimes difficult to estimate the shape factor of an irregular ion, or the volume of an excessively hydrated ion such as one derived from a carbohydrate molecule. In such cases it may be possible to calculate u_o from the diffusion coefficient at infinite dilution D_o of the ion, by the equation[6]

$$u_o = zD_oF/RT \qquad (2)$$

where z is the mean ionic charge[7,8], R the gas constant, T the temperature and F the Faraday equivalent.

For zwitterionic compounds such as amino acids or peptides the value of z at different pH values will depend on the extent of protonation of the compound[7,8], and may be calculated from the dissociation constants of the ionizing groups in the molecule. These dissociation constants are available for many simple peptides, and

TABLE I

MOBILITIES IN 30% AQUEOUS ACETIC ACID AT 25°

Compound	z	u_o*	u_z* *(calcd.)*	u_z* *(exptl.)*
Glycylglycine	+0.95	29.3	10.6	10.6
Diglycylglycine	+0.97	25.0	9.1	8.6
Leucylglycylglycine	+0.96**	20.6	7.5	7.4
Insulin	+5.8	37.2	13.5	9.6

* In 10^{-5} cm^2 volt^{-1} sec^{-1}.
** Assuming pK_1 = 3.21.

References p. 523.

may be estimated with reasonable accuracy for others[9]. Values of z calculated in this way for three peptides and for insulin at pH 1.8 are shown in Table I; the exact composition of insulin is now known[10], and the charge shown in the table is calculated for the monomeric form of molecular weight 5750.

The diffusion coefficients in water at 25° of the three peptides shown in Table I, and of many other peptides and amino acids, are known from the meticulous work of LONGSWORTH[11]. These values have been determined at low solute concentrations, and will not differ from D_0 by more than 1–2%[12]. The protonation of the zwitterions may be expected to have a very minor effect on their volumes[13], and hence on their D_0 values[14]. The values of u_0 at pH 1.8, calculated using LONGSWORTH'S values of D in equation (2), are given in Table I. The u_0 for insulin was calculated from FREDERICQ'S[15] diffusion coefficient, obtained by measurements in 20% aqueous dioxane in which the molecule is mainly monomeric.

The zone mobilities of these compounds in 30% (w/w) aqueous acetic acid (pH 1.8, as measured by glass electrode) on Whatman No. 3 paper at 25° were determined following a procedure already described in detail[1], and are shown in Table I. Insulin is known to be monomeric in this solvent system[16]. The absorbance of the paper in this experiment was 1.45 ml/g, so that ϱ was 0.59[3]. In the case of the three peptides, these experimental values of u_z proved to be in reasonable agreement with the values calculated from equations (1) and (2). The experimental u_z for insulin was lower than calculated from these equations, as would be expected for a polyvalent ion[1], but was of the correct order of magnitude.

The success of this correlation would make it appear that the assumptions involved in the theoretical treatment are justified, within the limits of accuracy to be expected

TABLE II

VARIATION IN MOBILITIES IN WATER AT 25° WITH pH

Compound	*pH* = 1		2		3		4	
	z	u_0*	z	u_0*	z	u_0*	z	u_0*
Glycine	0.96	3.92	0.69	2.82	0.18	0.74	0.02	0.09
Diglycylglycine	0.99	2.58	0.95	2.46	0.65	1.67	0.15	0.40

* Units: 10^{-4} cm^2 volt^{-1} sec^{-1}.

in paper electrophoresis. However, further work is obviously desirable to test the limits of applicability of equations (1) and (2), particularly for ions having $z > 1$. If the equations prove generally applicable to ions having $z \leqslant 1$, they should make it possible to choose optimum conditions for the separation of many amino acids or peptides on a more rational basis than hitherto. Thus amino acids may be made to travel more quickly or more slowly than peptides by controlling the pH of the background solution, as shown by the example in Table II.

References p. 523.

SUMMARY

Zone mobilities of peptides in 30% (w/w) aqueous acetic acid at 25° are in reasonable agreement with values calculated from the diffusion coefficients in water of the neutral compounds.

REFERENCES

1 J. T. EDWARD AND R. CRAWFORD, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 449.
2 H. G. KUNKEL AND A. TISELIUS, *J. Gen. Physiol.*, 38 (1951) 89.
3 R. CRAWFORD AND J. T. EDWARD, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 1543.
4 P. B. DAVIS AND H. C. JONES, *J. Am. Chem. Soc.*, 37 (1915) 1194.
5 J. T. EDWARD, *Chem. & Ind. (London)*, (1956) 929; *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, 27 (1956) 273.
6 L. G. LONGSWORTH, in T. SHEDLOVSKY, *Electrochemistry in Biology and Medicine*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1955, p. 225.
7 R. CONSDEN, A. H. GORDON AND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 40 (1946) 33.
8 M. LEDERER, *An Introduction to Paper Electrophoresis and Related Methods*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1955, p. 18.
9 E. J. COHN AND J. T. EDSALL, *Proteins, Amino Acids and Peptides*, Reinhold Publ. Corp., New York, 1943, pp. 75, 444.
10 F. SANGER, E. O. P. THOMPSON AND R. KITAI, *Biochem. J.*, 59 (1955) 509.
11 L. G. LONGSWORTH, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 5705.
12 L. J. GOSTING AND D. F. AKELEY, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 2058;
M. S. LYONS AND J. V. THOMAS, *ibid.*, 72 (1950) 4506.
13 J. T. EDWARD, *Chem. & Ind. (London)*, (1956) 774.
14 J. T. EDWARD, *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, 27 (1957) 287.
15 E. FREDERICQ, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 599.
16 L. A. Æ. SLUYTERMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 169.

Received April 5th, 1958

ANALYSE QUANTITATIVE DES AMINOACIDES AROMATIQUES (TYROSINE ET PHÉNYLALANINE) CONTENUS DANS L'HYDROLYSAT D'UNE FAIBLE QUANTITÉ DE PROTÉINE RADIOACTIVE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER*

ROGER MUNIER

Service de biochimie cellulaire, Institut Pasteur, Paris (France)

Au cours de l'étude du mode d'action des analogues structuraux d'aminoacides sur les biosynthèses effectuées par *Escherichia coli*[1], nous avons dû rechercher une méthode de dosage des aminoacides et spécialement des aminoacides aromatiques (phénylalanine et tyrosine) applicable à une faible quantité de protéine radioactive. Ayant utilisé la chromatographie quantitative sur papier pour l'étude des hydrolysats chlorhydriques de protéine, nous nous sommes aperçu que la teneur en tyrosine variait considérablement, pour une même protéine, d'un hydrolysat à l'autre. Tout se passait comme si la tyrosine était l'objet d'une dégradation irrégulière (voir également[2]).

Nous nous proposons de montrer ici:

(1) que la tyrosine se transforme partiellement en 3-chlorotyrosine au cours de l'hydrolyse chlorhydrique de très faibles quantités de protéine;

(2) que la teneur en tyrosine d'une protéine, après hydrolyse par l'acide chlorhydrique, n'est plus variable d'un hydrolysat à l'autre lorsqu'on tient compte de sa transformation partielle en 3-chlorotyrosine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Produits

^{14}C-Fructose

Le ^{14}C-fructose, uniformément marqué, utilisé nous a été fourni par le laboratoire des Radioisotopes de l'Institut Pasteur.

Aminoacides naturels

Les aminoacides naturels utilisés, L-phénylalanine, L-tyrosine, L-tryptophane, étaient des produits commerciaux (Hoffman La Roche) chromatographiquement purs.

Tyrosines chlorées

Les tyrosines chlorées ont été préparées par synthèse:

3,5-*Dichlorotyrosine*: Cet aminoacide a été préparé par chloruration directe de

* Ce travail a bénéficié de subventions de la Fondation Rockefeller de New-York, du "Jane Coffin Childs Memorial Fund for medical research".

Bibliographie p. 533.

la tyrosine (8 atomes de chlore pour une molécule de tyrosine selon la suggestion de THOMPSON[3]). Le chlore produit par addition lente (3 h 45 min) de 24 ml d'acide chlorhydrique concentré (d = 1.22) à des cristaux de permanganate de potassium est entraîné, par un courant d'azote, dans une solution de 6 g de L(—)-tyrosine (32 ml d'acide chlorhydrique 2 N + 1328 ml d'acide acétique pur). Lorsque le dégagement de chlore a cessé, le contact de ce dernier avec la solution de tyrosine est maintenu pendant 72 h. Après élimination sous vide (40°, évaporateur rotatif) de l'acide acétique et de l'eau, le résidu sec est entraîné, sur filtre de Buchner, par de l'éther sec (exempt de peroxydes). Une partie importante de l'acide acétique restant, et des impuretés très oxydables est entraînée dans le filtrat. Le résidu insoluble est dissout dans un peu d'eau. La 3,5-dichlorotyrosine est précipitée (en amenant le pH de la solution au pH isoélectrique de la chlorotyrosine) par addition ménagée d'ammoniaque. Le précipité est cristallisé dans l'eau chaude et traité par une très faible quantité de charbon actif (Activite 50 XL*). Après cinq cristallisations dans l'eau et séchage à 105°, le produit obtenu répond à la formule: $C_9H_9O_3NCl_2 \cdot H_2O$ [% de C: 40.4 (théorique), 40.2 (trouvé); % d'H: 4.12 (théorique), 4.10 (trouvé)].

3-Chlorotyrosine: Après préparation (par chloruration directe de la L(—)-tyrosine: 4 atomes de chlore pour une molécule de tyrosine selon la suggestion de THOMPSON[3]) d'un mélange environ équimoléculaire de 3-chlorotyrosine et de 3,5-dichlorotyrosine, la 3-chlorotyrosine est séparée de la 3,5-dichlorotyrosine par chromatographie sur colonne (3 × 31 cm) de résine cationique Dowex 50-x4 (200–400 mesh, forme hydrogène) dans l'acide chlorhydrique 2.5 N.

La résine échangeuse d'ions était préparée, après tamisage à l'état humide de la résine "minus 400 mesh", selon le procédé de MOORE ET STEIN[4]. Le mélange des

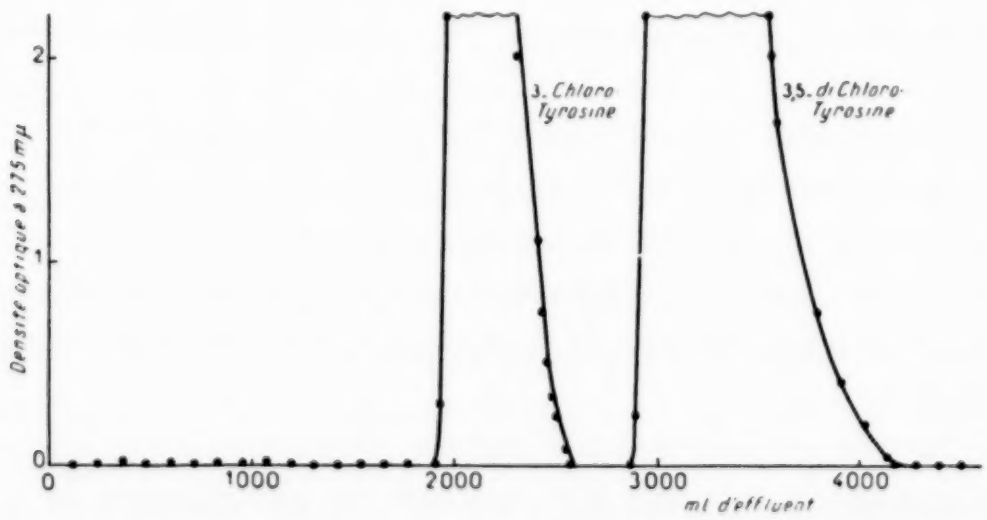


Fig. 1. Séparation de la 3-chlorotyrosine de la 3,5-dichlorotyrosine par chromatographie préparative sur colonne (3 × 31 cm) de résine cationique Dowex 50-x4 (200–400 mesh), forme hydrogène; échantillon soumis à la chromatographie: 1.3 g du mélange des chlorotyrosines en solution dans l'acide chlorhydrique 2.5 N (15 ml); élution par l'acide chlorhydrique 2.5 N: 1 ml/min; fractions collectées: 23 ml.

chlorotyrosines (1.3 g) en solution dans l'acide chlorhydrique 2.5 N (15 ml) est versé au sommet de la colonne de résine. Les substances sont éluées par l'acide chlor-

* Société Activite, 66 Rue d'Argenteuil, Paris 16e.

Bibliographie p. 533.

hydrique 2.5 *N* (1 ml/min ; fractions collectées : 23 ml). La concentration des substances dans l'éluat est déterminée par mesure de la densité optique à 275 mμ (spectrophotomètre de Beckman) des fractions collectées (voir Fig. 1). Les fractions contenant la 3-chlorotyrosine sont amenées à sec sous vide. Le résidu sec est dissout dans un volume d'eau minimum. La 3-chlorotyrosine est précipitée par addition ménagée d'ammoniaque (précipitation au pH isoélectrique), traitée (en solution aqueuse chaude) par une trace de charbon actif (Activite 50 XL), recristallisée dans l'eau. Le produit obtenu, après séchage à 105°, répond à la formule : $C_9H_{10}O_3NCl \cdot H_2O$ [% de C : 46.2 (théorique), 46.9 (trouvé) ; % d'H : 5.15 (théorique), 5.15 (trouvé)].

Les deux chlorotyrosines obtenues étaient chromatographiquement pures (système solvant de BOISSONNAS[5] ; révélation au réactif à la ninhydrine).

Protéines radioactives

Protéines dont tous les aminoacides sont radioactifs : La protéine utilisée dans cette étude était la fraction protéinique principale d'*E. coli*[2]. Un échantillon *radioactif* (uniformément marqué au carbone) de cette protéine était obtenu à partir d'*E. coli* souche ML 308 (poids sec bactérien initial : 76 μg/ml)* cultivé sur milieu (10 ml) minéral No. 63 (KH_2PO_4 : 13.6 g ; $(NH_4)_2SO_4$: 2 g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.2 g ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.0005 g ; pH 7.0 ; eau q.s.p. 1000 ml) contenant 1200 μg de ^{14}C-fructose uniformément marqué (40 μC). Après agitation de la culture à 37° jusqu'à épuisement de la source de carbone et d'énergie (30 à 45 min) les bactéries (poids sec bactérien final : 114 μg/ml) étaient fractionnées selon la technique de ROBERTS *et al.*[2] en vue de la préparation de la fraction protéinique principale d'*E. coli* : traitement à l'eau à 5% d'acide trichloracétique (0° ; 30 min) ; à l'alcool à 75% (50° ; 30 min), à l'eau à 5% d'acide trichloracétique chaud (100° ; 30 min ; 2 fois). Dans ces conditions, le résidu solide final du fractionnement représente 400 à 600 μg de fraction protéinique principale d'*E. coli* (12 μC environ).

Protéines dont un seul des aminoacides n'est pas radioactif : Ces échantillons de fraction protéinique principale d'*E. coli* dont un seul des aminoacides n'est pas radioactif (tous les autres aminoacides sont uniformément marqués dans tous leurs carbones) sont obtenus dans des conditions similaires à celles décrites précédemment et selon le principe des expériences de compétition isotopique introduit et développé par ROBERTS *et al.*[2].

Ici le ^{14}C-fructose et l'aminoacide naturel (tyrosine, phénylalanine ou tryptophane ; concentration finale : 10^{-3} *M*) sont ajoutés simultanément à la suspension bactérienne lavée*. Par suite de la compétition et des échanges pendant la biosynthèse des protéines entre l'aminoacide radioactif endogène, biosynthétisé par *E. coli* en présence de ^{14}C-fructose, et l'aminoacide non radioactif exogène, la protéine isolée ne contient pas plus de 2 à 5% de l'aminoacide radioactif (voir[2,1] et Tableau I de ce Mémoire).

* Culture en phase exponentielle de croissance sur fructose, lavée par centrifugation avec du milieu minéral 63 frais (3 fois).

Bibliographie p. 533.

Hydrolyse des protéines radioactives et préparation des échantillons à soumettre à la chromatographie

Dans les conditions où on observe la formation de 3-chlorotyrosine (voir au paragraphe: RÉSULTATS), le résidu final du fractionnement selon ROBERTS *et al.*[2] (fraction protéinique principale) est dissout dans l'acide chlorhydrique 12 *N* et transféré quantitativement dans un tube (2.5 ml d'acide). Après addition de 2.5 ml d'eau, le tube est scellé et son contenu soumis à l'hydrolyse (100°, 20 h). Après élimination de la plus grande partie de l'acide chlorhydrique à 45° sous courant d'azote (exempt d'oxygène), le résidu sec repris par quelques gouttes d'eau est à nouveau amené à sec (3 fois) puis maintenu sous vide en présence de potasse (4 à 6 jours).

Analyse chromatographique des aminoacides de l'hydrolysat de protéine radioactive

L'hydrolysat de protéine radioactive est soumis à l'analyse chromatographique sur papier (Whatman No. 4; feuille 56 × 46 cm) à deux dimensions avec écoulement contenu des solvants de BOISSONNAS[5].

1e dimension: Butanol tertiaire–méthylethylcétone–eau (4:4:2).

2e dimension: Butanol tertiaire–méthanol–eau (4:5:1). La chromatographie est interrompue lorsque le spot jaune de la phénolsulfone phtaléine (marqueur coloré à valeur de R_F légèrement plus élevée que celle de l'aminoacide le plus rapide) a atteint l'extrémité de la feuille de papier. Dans ces conditons, les spots de phénylalanine et de 3-chlorotyrosine sont nettement séparés.

Chromatographie sur papier quantitative

Une quantité d'hydrolysat de protéine (correspondant à 3 μC de protéine, soit environ 100 à 150 μg) est soumis à l'analyse chromatographique*; après repérage sur le chromatogramme des divers spots d'aminoacides radioactifs grâce à un radioautogramme (film Kodak-kodirex 30 × 40 cm), les morceaux de papier portant les spots sont découpés dans le chromatogramme. Les aminoacides sont élués par 2 à 8 ml d'eau (43°; 12 h, une goutte de chloroforme par tube) dans un tube bouché; 0.8 ml d'éluat sont versés dans une cupule d'aluminium; après séchage du contenu de la cupule, sa radioactivité est déterminée au compteur de Geiger (efficacité du compteur: 5.5%; reproductibilité entre deux comptages: 2%; reproductibilité entre deux pipettages et comptages d'un même éluat: 5%).

Connaissant l'activité spécifique par carbone du ^{14}C-fructose (uniformément marqué) fourni à la culture d'*E. coli*, le nombre de carbones dans chaque aminoacide, l'activité radioactive de chaque spot d'aminoacide (d'un même chromatogramme), il est possible de calculer le nombre de moles des divers aminoacides présents dans

* La méthionine est oxydée (eau oxygénée à 11 volumes) dans le spot d'hydrolysat de départ. Le chevauchement des spots de méthionine et phénylalanine est ainsi évité. Au cours de cette oxydation, il ne se forme pas de chlorotyrosine bien que les aminoacides soient sous forme de chlorhydrates. Cette oxydation ne doit pas être trop poussée si l'on veut éviter que la 3-chlorotyrosine, présente dans l'hydrolysat, ne s'oxyde partiellement en formant deux substances visibles, sur les chromatogrammes, sous forme de spots radioactifs allongés.

Bibliographie p. 533.

les protéines d'*E. coli* pour une mole de valine. Si nécessaire, les résultats sont corrigés pour les pertes qui ont lieu au cours de la chromatographie.

RÉSULTATS

Domaine d'application de la méthode

On pourra s'étonner de voir réaliser des hydrolyses d'aussi faibles quantités de protéine par des volumes d'acide chlorhydrique relativement importants. Il nous faut préciser ici les conditions expérimentales très particulières qui nous ont obligé à mettre au point cette méthode.

Lorsque nous effectuons des expériences de compétition isotopique (principe et technique développés par ROBERTS *et al.*[2]) destinées à étudier l'influence des agents exogènes (intermédiaires métaboliques, antimétabolites non radioactifs, etc.) sur la composition en aminoacides radioactifs des protéines biosynthétisées par *E. coli*, ce microorganisme croissant sur milieu minéral contenant une seule source de carbone et d'énergie uniformément radioactive, nous obtenons 400 à 600 μg de protéine radioactive (12 μC)*. En vue de son hydrolyse, cette faible quantité de protéine doit être quantitativement transvasée dans un tube (voir mode opératoire page 527) et, dans ces conditions, il est difficile d'utiliser une quantité d'acide chlorhydrique 12 *N* inférieure à 2.5 ml.

Divergence des teneurs en phénylalanine et tyrosine d'une même protéine d'un hydrolysat à l'autre

Lorsque nous avons voulu étudier la composition en aminoacides aromatiques (phénylalanine et tyrosine) de ces hydrolysats par chromatographie quantitative sur papier, nous n'avons obtenu que des résultats apparemment incohérents.

En effet, si on opère sur papier Whatman No. 1 (26 × 26 cm) en utilisant les conditions de développement du chromatogramme décrites par BOISSONNAS[5], la teneur en phénylalanine et tyrosine d'une même protéine paraît varier d'un hydrolysat à l'autre. Si le développement chromatographique est réalisé avec le même système solvant mais dans les conditions de développement du chromatogramme décrites page 527 (3 μC d'hydrolysat correspondant à 150 μg de protéine analysé par chromatogramme) on observe la présence constante d'un spot (a) radioactif de mobilité très voisine de celle de la phénylalanine et ne correspondant à aucun aminoacide connu (voir le cliché a de la Fig. 3). Dans ce dernier cas, la teneur en phénylalanine est constante, tandis que la teneur en tyrosine d'une même protéine varie d'un hydrolysat à l'autre.

Pour des hydrolysats correspondant à une même quantité de protéine, l'importance du spot a varie dans de larges limites d'une expérience à l'autre (voir Tableau I).

Transformation partielle de la tyrosine en 3-chlorotyrosine au cours de l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique d'une faible quantité de protéine radioactive

Le cliché de gauche de la Fig. 2, correspond à l'analyse chromatographique d'un mélange des aminoacides aromatiques isolés d'un hydrolysat de fraction protéinique

* Conditions opératoires similaires à celles décrites, page 526.

Bibliographie p. 533.

TABLEAU I

COMPOSITION EN AMINOACIDES DE LA FRACTION PROTÉINIQUE PRINCIPALE D'*E. coli*. EFFET DE L'HYDROLYSE, PAR L'ACIDE CHLORHYDRIQUE 6 *N*, SUR LA TRANSFORMATION DE LA TYROSINE EN 3-CHLOROTYROSINE

Aminoacides radioactifs (en moles par mole de valine dans la protéine)	*Protéines biosynthétisées en presence de ^{14}C-fructose**												
	seul									*et de*			
										L-Phénylalanine (10^{-3} M)		*L-Tyrosine (10^{-3} M)*	*L-Trypto-phane (10^{-3} M)*
Valine	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Phénylalanine	0.49	0.49	0.48	0.51	—	—	—	—	—	0.02***	—	0.51	0.50
Tyrosine**	0.33	0.33	0.33	0.35	0.34	0.37	0.37	0.33	0.33	0.32	0.31	0.0***	0.34
Leucine + isoleucine	2.10	2.04	1.90	2.17	1.95	1.97	1.98	1.91	1.90	1.92	1.90	1.90	1.95
Tyrosine transformée en													
3-chlorotyrosine (%)	13	14	16	16	12	9	15	94	69	28	37	—	23
Experience No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

* Fraction protéinique principale d'*E. coli* provenant d'une culture d'*E. coli* ML 308 (poids sec bacterien inital: 760 μg) sur 1,200 μg de ^{14}C-fructose uniformément marqué (40 μC) en présence et en l'absence d'aminoacides naturels (L-phénylalanine, L-tyrosine ou L-tryptophane: 10^{-3} *M*).

** Teneur en tyrosine determinée en tenant compte de sa transformation partielle en 3-chlorotyrosine au cours de l'hydrolyse (400 à 600 μg de protéine radioactive/5 ml d'acide chlorhydrique 6 *N*, 100°, 20 h).

*** Protéines dont tous les aminoacides sont radioactifs sauf la phénylalanine ou la tyrosine respectivement (voir page 526).

principale d'*E. coli* (1 mg de protéine/1 ml d'acide chlorhydrique 6 *N*, 20 h, 100°) par chromatographie sur charbon (Activite 50 XL) selon FROMAGEOT, JUTISZ ET LEDERER[6]. On peut remarquer la présence, sur ce chromatogramme d'un spot (réaction positive à la ninhydrine) ayant la mobilité du spot radioactif *a* présent sur le chiché a de la Fig. 3.

À la suite de cette observation, nous avons pensé que ce spot (*a*) correspondait à un produit de transformation de la tyrosine. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons soumis à l'hydrolyse chlorhydrique (100 μg de protéine/1 ml d'acide chlor-

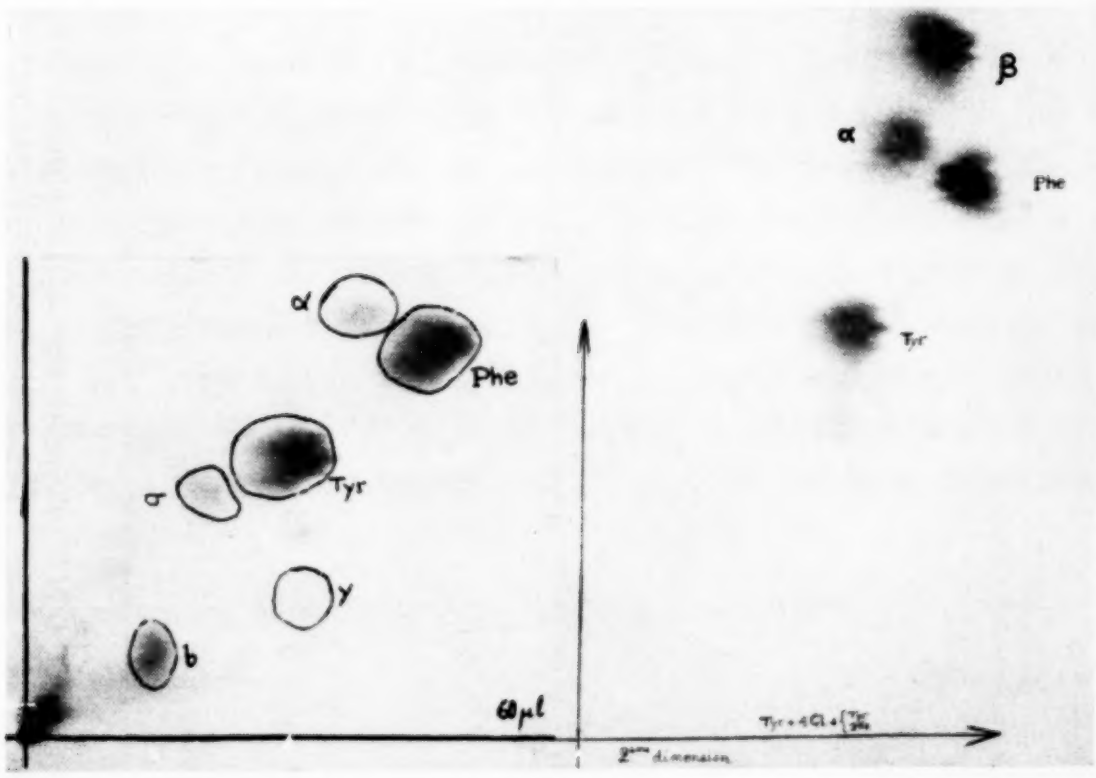


Fig. 2. Mise en évidence de la 3-chlorotyrosine dans un hydrolysat chlorhydrique de protéine. *Cliché de gauche*: mélange des aminoacides aromatiques obtenu par chromatographie sur charbon à partir de l'hydrolysat chlorhydrique de protéine (1 mg de protéine/1 ml d'acide 6 *N*, 100°, 24 h). Remarquer la présence de 3-chlorotyrosine (*a*) donnant une réaction positive à la ninhydrine. *Cliché de droite*: chromatogramme de substances pures montrant les mobilités relatives de la 3-chlorotyrosine (*a*), de la 3,5-dichlorotyrosine (β), de la phénylalanine (Phe), de la tyrosine (Tyr) dans le système solvant de BOISSONNAS[5].

hydrique 6 *N*, 100°, 20 h) des protéines radioactives dont un seul des aminoacides n'était pas radioactif (voir le mode de préparation de ces protéines, page 526). Le spot (*a*) radioactif est présent sur les chromatogrammes des hydrolysats de protéines dont tous les aminoacides sont radioactifs (cliché a, Fig. 3) et des protéines dont tous les aminoacides sont radioactifs à l'exception du tryptophane (cliché d, Fig. 3) ou de la phénylalanine (cliché c, Fig. 3); il est absent lorsque ces protéines radioactives ne referment pas de tyrosine radioactive (cliché b, Fig. 3).

Comme le montre le cliché photographique de la Fig. 4, relatif à un co-chromatogramme d'aminoacides aromatiques purs (phénylalanine, tyrosine, 3-chlorotyrosine de synthèse: 8–15 μg) et d'éluats de morceaux de papier contenant la substance radioactive du spot *a* (0.022 μC, 0.54 μg) le spot radioactif de la substance *a* se superpose dans ses moindres détails au spot violet de la 3-chlorotyrosine après révélation à la ninhydrine.

Bibliographie p. 533.

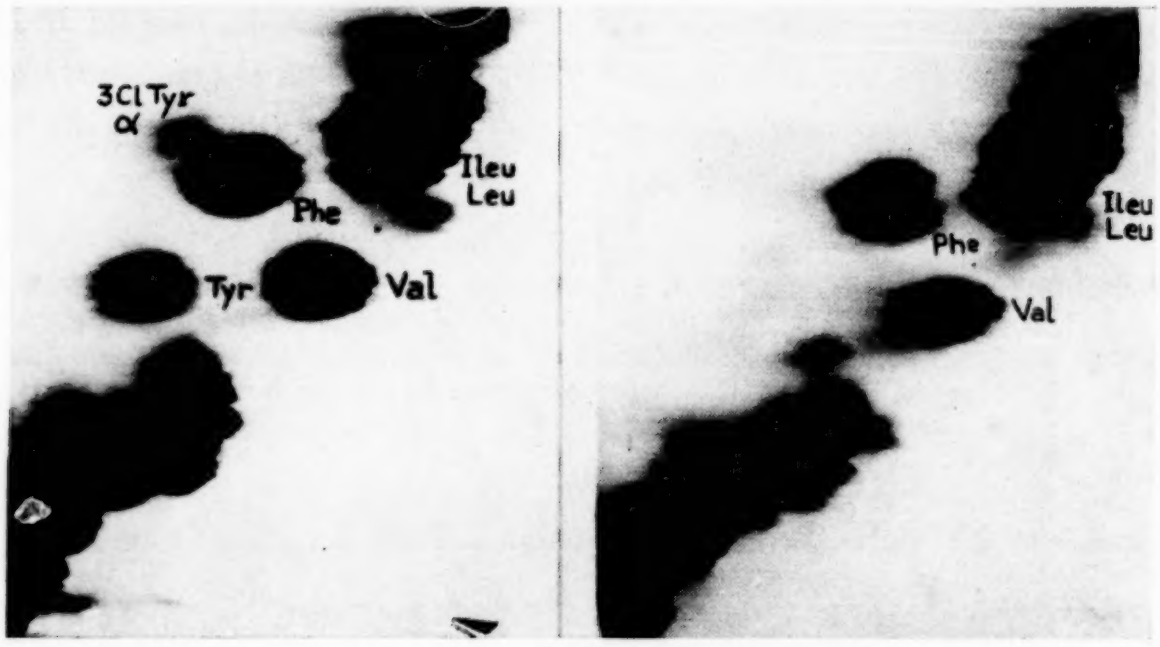


Fig. 3. Analyse chromatographique d'hydrolysats de protéines radioactives dont tous les amino-acides sont radioactifs (cliché a), et de protéines radioactives ne contenant pas de tyrosine radioactive (cliché b), de phénylalanine radioactive (cliché c) ou de tryptophane radioactif (cliché d); hydrolysat de fraction protéinique principale d'*E. coli* (400 à 600 μg de protéine radioactive/5 ml d'acide chlorhydrique 6 *N*, 100°, 20 h); chaque radioautogramme correspond au chromatogramme de l'hydrolysat de 150 μg de protéine environ (300,000 imp./min, compteur de Geiger à 5.5% de rendement). Noter l'absence simultanée de tyrosine et de 3-chlorotyrosine (*a*) radioactives sur le chromatogramme b.

Nous en concluons que la tyrosine se transforme partiellement en 3-chlorotyrosine au cours de l'hydrolyse chlorhydrique. S'il en est ainsi, la teneur en tyrosine d'une protéine ne doit plus varier d'un hydrolysat à l'autre lorsqu'on tient compte de cette transformation. Comme on peut le voir au Tableau I, cette prévision se vérifie parfaitement: quel que soit le pourcentage de tyrosine transformée en 3-chlorotyrosine au cours de l'hydrolyse chlorhydrique la teneur en tyrosine des protéines, calculée en tenant compte de cette transformation, reste constante.

Bibliographie p. 533.

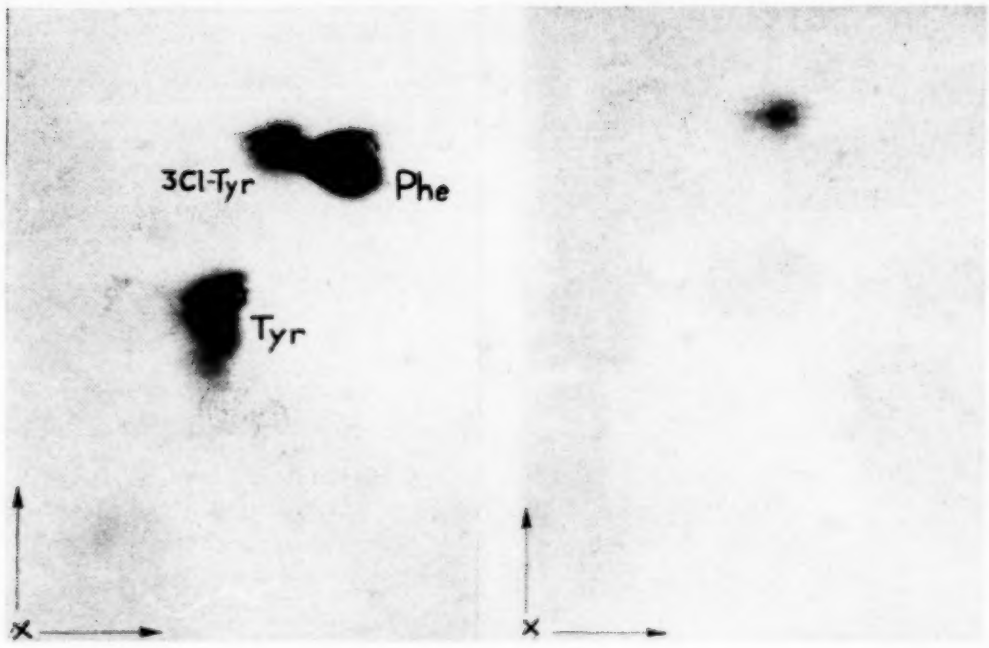


Fig. 4. Identification de la substance du spot radioactif *a* par co-chromatographie avec la 3-chlorotyrosine de synthèse. *Cliché de gauche*: chromatographie d'un mélange de substances pures, phénylalanine (Phe), tyrosine (Tyr), 3-chlorotyrosine (3Cl-Tyr) et d'éluat de morceaux de papier portant le spot de la substance radioactive (*a*) ayant la mobilité chromatographique de la 3-chlorotyrosine (mise en évidence des substances à l'aide du réactif à la ninhydrine). *Cliché de droite*: radioautogramme du chromatogramme précédent avant révélation à la ninhydrine.

DISCUSSION

Comme le montre nettement l'ensemble des résultats rapportés précédemment, la tyrosine se transforme en 3-chlorotyrosine au cours de l'hydrolyse chlorhydrique d'une faible quantité de protéine radioactive. En effet, la substance du spot *a* qui est toujours présent dans les chromatogrammes d'hydrolysats chlorhydriques de protéine et qui ne correspond à aucun aminoacide naturel connu, a les propriétés:

(1) d'un aminoacide: réaction positive à la ninhydrine;

(2) d'une substance aromatique: isolement sélectif par chromatographie sur charbon dans les mêmes conditions que les aminoacides aromatiques;

(3) d'un dérivé de la tyrosine: la teneur en tyrosine d'une protéine n'étant constant d'un hydrolysat à l'autre (quelle que soit l'importance de la substance *a*) que si l'on admet, pour le calcul, que la substance *a* est un produit de transformation simple de la tyrosine;

(4) de la 3-chlorotyrosine: par co-chromatographie, le spot radioactif de la substance *a* se superpose dans ses moindres détails au spot violet (révélation à la ninhydrine) de la 3-chlorotyrosine de synthèse.

Cette transformation partielle de la tyrosine en 3-chlorotyrosine au cours de l'hydrolyse chlorhydrique est due vraisemblablement au chlore libre contenu dans l'acide. Il faut cependant signaler, que dans certains cas, un pourcentage très élevé de la tyrosine est transformé en 3-chlorotyrosine (voir expérience 8, 9, 10, 11 du Tableau I).

Si cette transformation apparaît très importante dans le cas qui nous intéresse, c'est que la quantité de protéine soumise à l'hydrolyse est faible par rapport à la quantité d'acide mis en jeu (environ 100 μg de protéine/ml d'acide chlorhydrique

Bibliographie p. 533.

6 *N*). Ce sont les conditions habituelles de travail lorsqu'on manipule sur de faibles quantités de protéines (400–600 μg; 12 μC) à haute activité radioactive spécifique en vue de leur analyse par chromatographie quantitative sur papier.

RÉSUMÉ

Lors de l'hydrolyse de faibles quantités de protéines radioactives par l'acide chlorhydrique, on observe la formation de 3-chlorotyrosine.

C'est seulement en tenant compte de cette transformation que les résultats obtenus pour la teneur en tyrosine d'une protéine sont identiques d'un hydrolysat à l'autre.

SUMMARY

During the hydrolysis of small quantities of radioactive proteins with hydrochloric acid 3-chlorotyrosine is formed.

Constant values for the tyrosine content of a protein can only be obtained if this transformation is taken into account.

BIBLIOGRAPHIE

[1] R. MUNIER ET G. N. COHEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, sous presse.
[2] R. B. ROBERTS, P. H. ABELSON, D. B. COWIE, E. T. BOLTON ET R. J. BRITTEN, *Studies of Biosynthesis in Escherichia coli*, Carnegie Inst., Washington, 1955.
[3] E. O. P. THOMPSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 440.
[4] S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 663.
[5] R. A. BOISSONNAS, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 1966.
[6] C. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.

Reçu le 6 mai 1958

QUANTITATIVE PAPER-CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF PHENOLS*

RICHARD W. KEITH, DUANE LE TOURNEAU AND DENNIS MAHLUM**
Department of Agricultural Chemistry, University of Idaho, Moscow, Id. (U.S.A.)

A routine paper-chromatographic method for the quantitative analysis of mixtures of phenols was needed for research in this laboratory. While such methods as comparison of spot areas and intensity have been described[1], these methods are subject to certain limitations[2]. Thus, it seemed desirable to develop a method in which the phenols would be eluted from the chromatogram and measured colorimetrically after reaction with an appropriate reagent. The following method has proven satisfactory.

METHODS AND MATERIALS

Reagents

1. Folin-Ciocalteu reagent[1].
2. 20% Na_2CO_3 solution (w/v).

Solvent systems

1. Organic phase of benzene–acetic acid–water (2:2:1, v/v/v). Irrigation time: 24 h.
2. 20% acetic acid. Irrigation time: 6 h.
3. Organic phase of ethyl acetate–acetic acid–water (2:1:2, v/v/v). Irrigation time: 6 h.

Chromatography papers

Whatman grades 1, 4, and 54.

Phenolic samples

The compounds were dissolved in 50% ethanol. 10 to 100 μg were applied with a micropipette by streaking a 2.5-inch strip on the reference line of the sheet of paper. Spots of the known compounds were applied on either side of the main band containing the unknown. The papers were then irrigated using descending technique at room temperature. Irrigation times listed are approximate times for Whatman No. 54 paper.

Elution and determination

After the chromatograms had been dried, the side strips containing the known spots were cut from the chromatogram. The spots on the side strips were located by spraying first with the Folin-Ciocalteu reagent (diluted 1:1 with H_2O) and then with Na_2CO_3

* Published with the approval of the Director of the Idaho Agricultural Experiment Station as Research Paper No. 445.
** Technician, Assistant Agricultural Chemist, and Junior Assistant Agricultural Chemist.

References p. 536.

solution. The side strips were placed alongside the center portion of the chromatogram and a rectangular area in which the unknown would be located was marked lightly with pencil. The rectangle, usually $2 \times 2^1/_2''$, was removed, cut into small pieces and placed in a medium porosity sintered glass crucible. The crucible was placed in a crucible holder on a filter flask containing a test tube. The paper was then washed twice with 10-ml portions of hot water and the eluate collected in the test tube. Gentle suction was applied to remove most of the water from the paper and the crucible. The eluate was transferred quantitatively to a 25-ml volumetric flask. To the flask was added 0.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent (diluted 1:1 with water), 2 ml of 20% Na_2CO_3 solution, and enough water to bring to volume. The blue color was allowed to develop for 2 hours. The optical density was determined with a Coleman Universal Spectrophotometer at 660 mμ with a PC-5 filter. In all cases, from each irrigated sheet a rectangle of paper, the same size as that containing the sample was treated in the same manner and used as a blank.

RESULTS AND DISCUSSION

Standard curves were obtained for some representative phenols (resorcinol, gallic acid, and caffeic acid). Fig. 1 is the standard curve for gallic acid. The method is sensitive enough to determine easily 10 μg of gallic acid per 25 ml of solution.

R_F values were determined for some of the common phenols. Table I lists the R_F values for these phenols in 20% acetic acid and ethyl acetate–acetic acid–water. The mobilities of these phenols in benzene–acetic acid–water are calculated as $R_{catechol}$ values as the solvent dripped off the end of the paper.

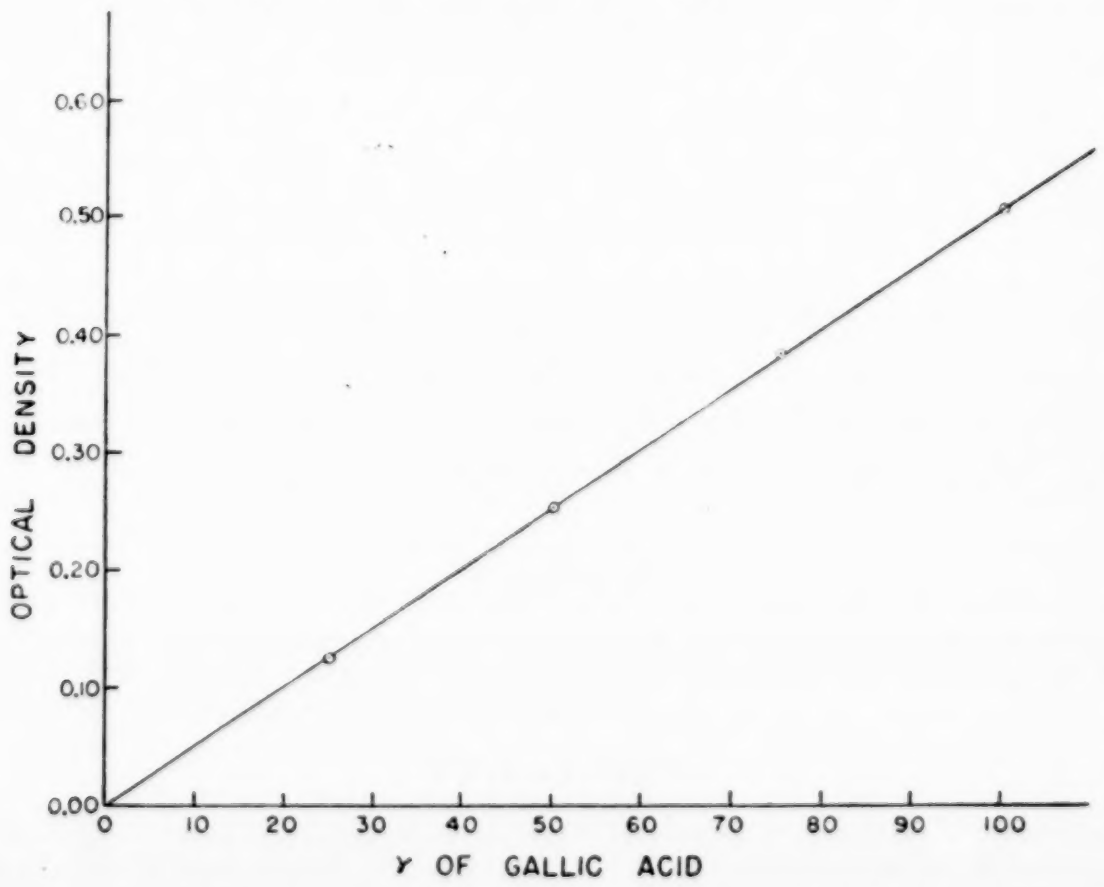


Fig. 1. Standard curve for gallic acid which was chromatographed, eluted, and reacted with Folin-Ciocalteu reagent. Whatman No. 54 paper irrigated with benzene–acetic acid–water (2:2:1). Each point is an average of 3 determinations.

References p. 536.

TABLE I

AVERAGE R_F AND $R_{CATECHOL}$ VALUES OF PHENOLS ON WHATMAN NO. 54 PAPER

Compound	R_F		$R_{catechol}$
	20% Acetic acid	*Ethyl acetate–acetic acid–water (2: 1: 2)*	*Benzene–acetic acid–water (2: 2: 1)*
Catechol	0.74	0.92	1.00
Resorcinol	0.70	0.91	0.30
Hydroquinone	0.71	0.91	0.28
Protocatechuic acid	0.62	0.86	0.13
2,4-Dihydroxybenzoic acid	0.63	0.94	0.58
2,5-Dihydroxybenzoic acid	0.66	0.94	0.42
Protocatechuic aldehyde	0.66	0.91	0.30
Orcinol	0.68	0.92	0.49
Phloroglucinol	0.61	0.74	0.01
Pyrogallol	0.63	0.82	0.10
Gallic acid	0.44	0.69	0.01
Caffeic acid	0.38	0.93	0.16
Chlorogenic acid	0.68	0.74	0.01

An inspection of the table shows that one solvent system may be used to separate certain compounds. Thus, orcinol and protocatechuic aldehyde can be separated with benzene–acetic acid–water but not with the other two irrigants. Even with the three irrigants it was not possible to separate the following groups: resorcinol, hydroquinone, and protocatechuic aldehyde; protocatechuic acid and pyrogallol; phloroglucinol and chlorogenic acid.

While several colorimetric methods for phenols have been reported, the procedure using the Folin-Ciocalteu reagent was chosen because it is a rapid, sensitive method applicable to phenols[1]. Although the procedure has given reproducible results, certain precautions are to be noted. The reaction is nonspecific in that other reducing substances will react with the reagent. Preliminary experiments indicated that certain chromatography papers contained impurities which might result in colored and variable blanks. S & S papers Nos. 589 and 598 were found to do so, and thus were not satisfactory.

Similarly, certain solvent systems may contain reducing substances as impurities which may remain on the paper and interfere with the quantitative method. It has been found in the present study that high and variable blanks were attained from paper that had been irrigated with butanol–acetic acid–water (4 : 1 : 5, v/v/v).

SUMMARY

A routine paper-chromatographic method for the quantitative determination of phenols is described. After elution, the phenols are measured colorimetrically using the Folin-Ciocalteu reagent.

REFERENCES

[1] H. G. BRAY AND W. V. THORPE, Analysis of Phenolic Compounds of Interest in Metabolism, in D. GLICK, *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. I, Interscience Publ., New York, 1954, pp. 27–52.
[2] R. J. BLOCK, E. L. DURRUM AND G. ZWEIG, *Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press, Inc , New York, 1955.

Received April 15th, 1958

THE CORRELATION BETWEEN STRUCTURE AND PAPER CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOUR OF SOME FLAVONOID* COMPOUNDS AND TANNINS

D. G. ROUX AND S. R. EVELYN

Leather Industries Research Institute, Rhodes University, Grahamstown (South Africa)

INTRODUCTION

The chromatographic behaviour of compounds belonging to the C_6-C_3-C_6 group of naturally-occurring "flavonoids" has been examined by BATE-SMITH[1,2], BATE-SMITH AND WESTALL[3], BRADFIELD AND BATE-SMITH[4], GAGE, DOUGLASS AND WENDER[5], and also by ROBERTS AND WOOD[6] and ROBERTS, CARTWRIGHT AND WOOD[7]. The precise mechanism of the migration of these compounds relative to the cellulose substrate is still largely unknown under those conditions where either partitioning or adsorption effects are considered to predominate[8,9,10].

BATE-SMITH and co-workers[3,4] observed regularities in the behaviour of certain phenolic compounds during partition paper chromatography, and found that the R_F values were related to the number of hydroxy groups on the C_{15} skeleton, and were also influenced by the spatial orientation of the "flavonoid" unit as a whole. In many instances a straight line relationship was obtained when the number of substituent hydroxyl groups was plotted against log $(1/R_F - 1)$.

ROBERTS, CARTWRIGHT AND WOOD[7] examined the chromatographic behaviour of phenolic compounds in water or in 2% acetic acid where adsorptive rather than partitioning effects appear to play the main role. They showed that for catechins and their gallates, and also other C_6 polyhydroxy-phenols and their derivatives the R_F values are slightly decreased by increases in the degree of hydroxylation. ROBERTS AND WOOD[6] had previously shown that water caused the separation of the optical antipodes of catechins, epicatechins, gallocatechins and epigallocatechins on paper chromatograms.

In the present work the R_F values of certain catechins, flavonols, 2,3-dihydroflavonols and flavan-3,4-diols are studied in water-saturated *sec.*-butanol as a "partitioning" mixture, and in water only as an "adsorptive" solvent. Reference is also made to their behaviour in the conventional *n*-butanol–acetic acid–water (4:1:5) "partitioning" mixture. The behaviour of condensed tannins in relation to molecular weight is studied in the same solvent systems.

EXPERIMENTAL

Compounds

The catechins, flavonols, 2,3-dihydroflavonols were obtained from natural sources.

* The term "flavonoid" is used in this paper to cover the broad group of C_6-C_3-C_6 compounds.

DL-*epi*-7,3′,4′-Trihydroxyflavan-3-ol was kindly presented by Dr. P. MAITLAND, Cambridge University. Of the flavan-3,4-diols, melacacidin, was obtained from *Acacia melanoxylon*[11]. 7,3′,4′,5′-Tetrahydroxyflavan-3,4-diol and 7,3′,4′-trihydroxyflavan-3,4-diol were obtained by the hydrogenation of dihydrorobinetin and dihydrofisetin (fustin), using platinum oxide as catalyst[12]. 5,7,3′,4′,5′-Pentahydroxyflavan-3,4-diol and 5,7,3′,4′-tetrahydroxyflavan-3,4-diol were obtained by reduction of ampeloptin and taxifolin (dihydromyricetin and dihydroquercetin resp.) with sodium boron hydride using the method of SWAIN[13].

Due to the complexity of the wattle tannin mixture, the mature fresh bark of *Acacia mollissima* was initially extracted with ethyl acetate and finally with methanol[14]. The ethyl acetate fraction C_1 (see ref.[14]) and the methanol extracted fraction C_3 of average molecular weights 1290 and 1507, were used in this work.

Chromatographic conditions

Paper chromatograms of the "flavonoid" compounds were run on Whatman No. 1. paper in a constant temperature room at 21.1°. Downward migration was used for the water-saturated *sec.*-butanol and *n*-butanol–acetic acid–water mixtures, and upward migration for water only.

Although the *n*-butanol–acetic acid–water mixture has been widely used for the chromatographic study of "flavonoid" and related compounds, the water-saturated *sec.*-butanol (2-butanol) mixture permits the migration of C_{15} compounds as discrete almost flat spots. By comparison this group of compounds migrates as characteristically oval spots with slight trailing in the upper phase of the *n*-butanol–acetic acid–water (4:1:5) mixture.

Spraying reagents

Ammoniacal silver nitrate was generally used to locate flavonoid compounds. The authors' toluene-*p*-sulphonic acid reagent which gives pink colorations on paper sheets with leuco-anthocyanins (flavan-3,4-diols), and which has been used for locating such compounds[15], was found to give orange-yellow colours with the flavan-3,4-diols in which the 5-position is hydroxylated.

R_F values were obtained by measurement from the starting line to the centre of the spot.

Fractionation of tannins by the "partitioning" principle

The chromatographic behaviour of the tannins was studied on thick (Whatman No. 3) paper sheets using the "preparative" method[16] with *n*-butanol–acetic acid–water (6:1:2) as irrigant. The acid medium was preferred in order to minimise possible oxidation of the tannins. The tannin mixture was streaked on to the sheet and after development of the chromatogram, and drying, bands were cut to correspond with each of the R_F values 0.0–0.6 and also 0.7 + 0.8, so that the centre of each band corresponds to these R_F values. The band strips were eluted with ethanol–water mixtures[16] and the eluants from each band concentrated under vacuum.

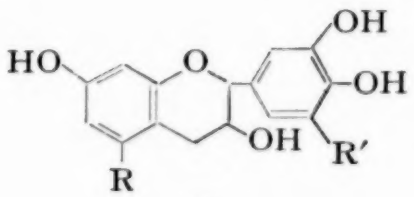
References p. 544.

Fractionation of tannins by the "adsorption" principle

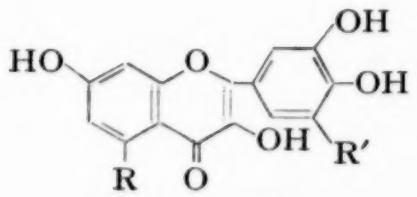
Fractionation was performed as above by the "preparative" method using 2% acetic acid as irrigant. For details see ref.[14].

Molecular weight estimation

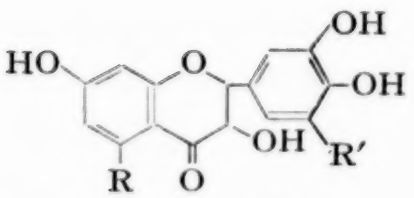
The fractions obtained were methylated with excess diazomethane[17] and analysed for methoxyl content by using the absorption method of VIEBOCH AND BRECHER[18]. Molecular weights of the methylated tannin fractions were determined using the RAY[19] ebulliometer as modified by EVELYN[17,20] and incorporating improvements detailed by SMITH[21]. The molecular weights of the unsubstituted tannins were calculated from the determined molecular weights of the methylated derivatives and their methoxyl values.



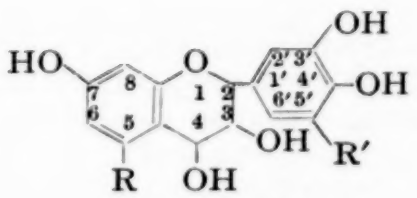
(I)



(II)



(III)



(IV)

RESULTS

Partition and adsorption paper chromatography of flavonoid compounds

Table I gives the R_F values of the following classes of compounds in the water-saturated *sec.*-butanol and in water: *catechins or flavan-3-ols*, *d*-gallocatechin (I, R = OH, R′ = OH), *d*-catechin (I, R = OH, R′ = H) and *dl-epi-7,3′,4′*-trihydroxyflavan-3-ol; *flavonols*, myricetin (II, R = OH, R′ = OH), quercetin (II, R = OH, R′ = H), robinetin (II, R = H, R′ = OH), fisetin (II, R = H, R′ = H); *dihydroflavonols*, ampeloptin (III, R = OH, R′ = OH), taxifolin (III, R = OH, R′ = H), dihydrorobinetin (III, R = H, R′ = OH) and fustin (III, R = H, R′ = H); *flavan-3,4-diols* (IV), the nomenclature of these compounds is obvious and follows the same sequence of hydroxylation as above. The number of phenolic hydroxyl groups is indicated for each compound in Table I.

Partition and adsorption chromatography of condensed tannins from black wattle barks

Table II gives the average molecular weights of the various tannin fractions in the partitioning mixture in relation to their mean R_F values. Fig. 1 illustrates the relationship between log $(1/R_F - 1)$ or R_M and average molecular weight.

Wattle and quebracho tannins show similar average molecular weight/R_F

TABLE I

R_F VALUES OF "FLAVONOID" COMPOUNDS IN WATER-SATURATED *sec.*-BUTANOL AND IN WATER

Compound	*Number of OH groups*	R_F *in sec.-butanol*		R_F *in water*	
Catechins or flavan-3-ols					
d-Gallocatechin	6	0.54		0.32	
d-Catechin	5	0.67		0.35	
dl-epi-7,3′,4′-Trihydroxyflavan-3-ol	4	0.79		0.42	0.47
Flavonols					
Myricetin	6	0.65		0.0	
Quercetin	5	0.74		0.0	
Robinetin	5	0.59		0.0	
Fisetin	4	0.71		0.0	
7,8,3′,4′-Tetrahydroxyflavonol	5	0.41		0.0	
2,3-Dihydroflavonols					
Ampeloptin	6	0.73		0.24	
Taxifolin	5	0.80		0.28	
Dihydrorobinetin	5	0.68		0.35	
Fustin	4	0.81		0.36	
Flavan-3,4-diols					
5,7,3′,4′,5′-Pentahydroxyflavan-3,4-diol	7	0.48		0.45	
5,7,3′,4′-Tetrahydroxyflavan-3,4-diol	6	0.64		0.49	
7,3′,4′,5′-Tetrahydroxyflavan-3,4-diol	6	0.54		0.47	
7,3′,4′-Trihydroxyflavan-3,4-diol	5	0.68		0.48	
7,8,3′,4′-Tetrahydroxyflavan-3,4-diol	6	0.41	0.43	0.43	0.48

TABLE II

THE VARIATION OF THE AVERAGE MOLECULAR WEIGHT OF WATTLE TANNINS WITH R_F IN *n*-BUTANOL–ACETIC ACID–WATER (UPPER PHASE)

Mean R_F	*Wattle fraction* C_1		*Wattle fraction* C_3	
	*% extract eluted**	*molecular** weight of tannins*	*% extract eluted*	*molecular** weight of tannins*
0.0	1.1	—	12.5	2471
0.1	5.7	2045 *a*	27.0	1952 *b*
0.2	14.2	1457	33.3	1661
0.3	24.6	1271	20.6	1354
0.4	28.9	1018	4.1	1210 *b*
0.5	15.9	779	0.6	—
0.6	6.3	821 *a*	—	—
0.7 + 0.8	3.4	—	—	—
% recovery	80.6		68.6	
Determined av. mol. wt.		1284		1507

* Sugars run to $R_F = 1$–2 in the solvent system and the weight distribution therefore gives no indication of the tannin content of each fraction.

** The number-average molecular weights were obtained from the mean of readings at four concentrations, as readings are independent of concentration. Due to insufficient material resulting from fractionation only two readings were taken for samples designated *a*, and only one reading for samples marked *b*.

References p. 544.

relationships during "adsorption" separation in 2% acetic acid on thick sheets[13]. The average molecular weight of the "condensed" tannins increases progressively with decrease of R_F over the ranges 554–3240 for wattle and 790–2350 for quebracho.

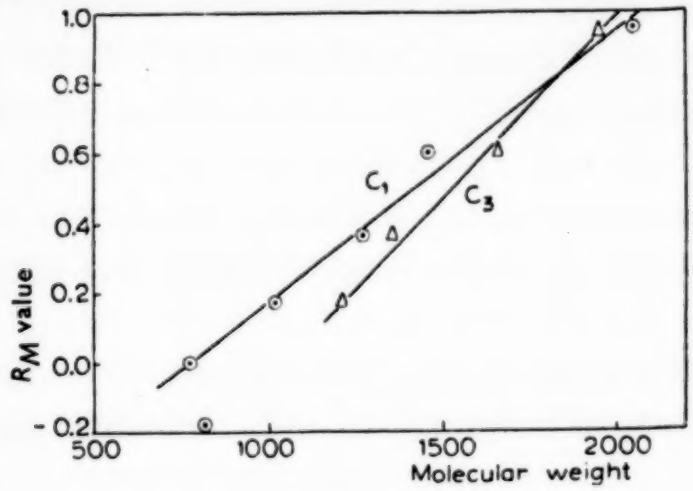


Fig. 1

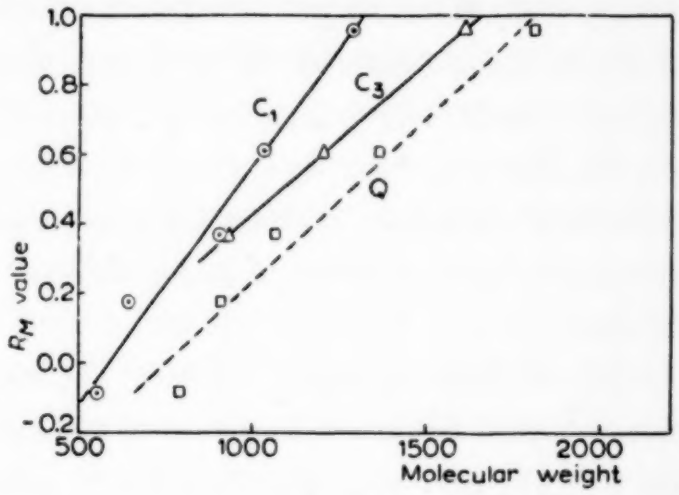


Fig. 2

Fig. 1. The relationships between molecular weight and R_M (= log ($^1/R_F$ — 1)) for wattle tannin fractions C_1 (ethyl acetate soluble) and C_3 (methanol soluble) in *n*-butanol–acetic acid–water (6:1:2).

Fig. 2. The relationship between molecular weight and R_M for wattle tannin fractions C_1 and C_3, and for commercial quebracho tannins (Q) in 2% acetic acid.

Fig. 2 shows the relationship between R_M and average molecular weight in 2% acetic acid for the same wattle tannin fractions as used for partitioning separation, and also for quebracho tannins.

DISCUSSION

One of the most notable phenomena of the paper chromatography of flavonoid compounds in aqueous medium is the immobility of the aglycones of flavonols, flavones and anthocyanidins, aurones and chalcones[5,22,23]. ROUX[10] considered that the zero R_F in water was associated with the planar and also resonating nature of the C_{15} compound as a whole, and this view was later supported by ROBERTS and co-workers[7]. Further support comes from observation that in order that a dye may have affinity for cellulose (cotton), the molecule should have the ability of taking up a linear or planar configuration, and should contain hydrogen-bonding groups, preferably spaced some multiple of 10.3 Å apart[24–26]. Evidence is strongly in favour of a lock and key process of adsorption[27]. As soon as the planar nature of the C_{15} unit is modified through the attachment of sugar residues, *e.g.* glycosides of flavonols and anthocyanins, or through the removal of a double bond in the heterocyclic ring, *e.g.* 2,3-dihydroflavonols, mobility is conferred on the unit in aqueous medium. This behaviour of the above classes of compounds is of great diagnostic value in two-dimensional paper chromatography.

The principle of slight reduction of R_F with increase of hydroxylation in water as solvent, first shown by ROBERTS, CARTWRIGHT AND WOOD[7], is clearly demonstrated for the catechin series in Table I, and for the catechins, gallocatechins and their gallates[7]. The 2,3-dihydroflavonols also show a decrease of R_F with increase of hydroxylation (Table I) although their relative configurations are not known. This

References p. 544.

rule by ROBERTS and co-workers does not apply in all instances, however, and appears to be valid only for increases of *phenolic hydroxylation*. For example, on hydrogenation of the 2,3-dihydroflavonols the R_F of the reduction product is increased from 0.24–0.36 to 0.45–0.49. This large increase is due to the introduction of an aliphatic hydroxyl group in the 4 position in the place of a carbonyl group. The flavan-3,4-diols (two aliphatic hydroxyls) also have higher R_F values than the corresponding catechins (one aliphatic hydroxyl, Table I) in aqueous irrigants. The general rule thus appears to be that increase in *phenolic hydroxylation* decreases the R_F of C_{15} compounds in water, but that increase of *aliphatic hydroxylation* (in the heterocyclic ring), increases the R_F.

From data by GAGE, DOUGLASS AND WENDER[5] it may be deduced that for flavonols and flavones, increase of phenolic hydroxylation results in a decrease in R_F also in 15% and 60% aqueous acetic acid.

In the partitioning mixture, *sec.*-butanol, the same rule demonstrated by BATE-SMITH and co-workers[3,4] for *n*-butanol–acetic acid–water solvent mixture applies; namely, that the R_F is reduced with increase of hydroxylation (see catechin series in Table I and also note the following R_F's in butanol–acetic acid–water: *l*-epiafzelechin (0.73)[28], *l*-epicatechin (0.65)[4] and *l*-epigallocatechin (0.47)[4]). This phenomenon is valid also for the introduction of aliphatic hydroxyl groups, *e.g.* the hydrogenation of the 2,3-dihydroflavonols (one aliphatic hydroxyl) to the corresponding flavan-3,4-diols (two aliphatic hydroxyl groups), and is accompanied by a decrease in R_F in each instance in partitioning solvents. Also the presence of two *ortho*-hydroxy groups on different benzene nuclei, *e.g.* 7,8,3′,4′-tetrahydroxyflavonol and 7,8,3′,4′-tetrahydroxyflavan-3,4-diol, appears to have an abnormally large effect in reducing the R_F compared with compounds of the same type, and containing the same number of substituent hydroxyl groups (see Table I). Similarly data by GAGE, DOUGLASS AND WENDER[5] show that quercetagetin (5,6,7,3′,4′-pentahydroxyflavonol) and gossypetin (5,7,8,3′,4′-pentahydroxyflavonol) both possessing two *ortho*-hydroxy groups on different benzene nuclei, have lower R_F values (0.22 and 0.21 respectively) in *n*-butanol–acetic acid–water (4:1:5) than myricetin (5,7,3′,4′,5′-pentahydroxyflavonol, $R_F = 0.45$) with the *ortho*-hydroxy group present on only one phenyl nucleus.

Amongst the dihydroflavonols (Table I) the similar R_F values of the pairs ampeloptin (six OH groups) and dihydrorobinetin (five OH groups), and of taxifolin (five OH groups) and fustin (four OH groups) is of interest. The abnormally high R_F values of ampeloptin and taxifolin, both of which have hydroxyl groups in 5-position, is due to the strong intra-molecular hydrogen bond formed between this hydroxyl and the carbonyl group at the 4-position. Ampeloptin and taxifolin, therefore, have similar R_F's as dihydrorobinetin and fustin respectively where the hydroxy group in the 5-position is absent. The reduction of hydroxyl character with the formation of chelate rings was previously observed by BATE-SMITH AND WESTALL[3] for phenolic carboxylic acids.

Finally, it should be noticed that, by comparison, the 2,3-dihydroflavonols always have higher R_F values than the corresponding flavonols themselves, *e.g.*

References p. 544.

myricetin → ampeloptin $\Delta R_F = 0.08$, quercetin → taxifolin $\Delta R_F = 0.07$, robinetin → dihydrorobinetin $\Delta R_F = 0.09$ and fisetin → fustin $\Delta R_F = 0.10$. This increase in R_F is probably associated with the conversion from a planar flavonol structure to non-planar (two asymmetrical carbon atoms) dihydroflavonol structure. The planar flavonol structures would show slightly higher affinity for cellulose than the corresponding dihydroflavonols. This theory was first advanced by ROBERTS[29] to explain differences in R_F between epicatechins (lower R_F) and catechins. Similar behaviour in the butanol–acetic acid–water partitioning mixture of the above series of flavonoid compounds may also be deduced from tables previously presented in ref.[4].

The chromatographic behaviour of condensed tannins some of which may be regarded as polymers of flavan-3-ols (catechins)[30–32] and of flavan-3,4-diols (leucoanthocyanins)[33–36], is of interest. The condensed tannins of black wattle bark (*Acacia mollissima*) show an increase of R_F with decrease of average molecular weight in both "partitioning" (Table II) and "adsorption"[14] solvents on paper chromatograms. The straight-line relationship between R_M and molecular weight in both instances emphasises the regularity of this relationship (Figs. 1 and 2). BATE-SMITH AND WESTALL[3] had previously found a straight-line relationship between R_M and the *degree of hydroxylation* for C_{15} "flavonoid" compounds of related structure.

PETERS AND SUMNER[37] (see also ref.[7]) have shown the correlation between affinity for cellulose and molecular weight of a large number of anthraquinone derivatives. This observation apparently agrees with the present findings of the linear R_M/molecular weight relationship of the tannins, if the mobility of the tannins on the cellulose substrate may be regarded as a measure of their "affinity" for cellulose. This represents the first occasion on which a linear relationship between R_M and average molecular weight of naturally-occurring compounds has been established.

The studies of chromatographic behaviour of the "flavonoid" compounds and of the tannins are of diagnostic value in interpreting the nature of the complex mixture of compounds usually present in natural plant extracts by means of paper chromatography.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express their gratitude to Dr. T. KUBOTA, Institute of Polytechnics, Osaka, Japan, and to Dr. P. MAITLAND, Cambridge University, England, for specimen compounds.

This work is financed by the Annual Grant of the South African Wattle Growers' Union to the Leather Industries Research Institute.

SUMMARY

Various factors influencing the paper chromatographic behaviour of "flavonoid" compounds in "partitioning" and "adsorption" solvent systems are examined Naturally-occurring "condensed" tannins are also examined in these solvent systems, and it is shown that the average molecular weight of the tannins increases with decrease of R_F, and that a linear relationship exists between R_M and their average molecular weight.

This study is of value in interpreting chromatograms of naturally-occurring tannin–"flavonoid" mixtures.

References p. 544.

REFERENCES

1 E. C. BATE-SMITH, *Biochem. Soc. Symposia (Cambridge, Engl.)*, 3 (1949) 62.
2 E. C. BATE-SMITH, *Biochem. J.*, 58 (1954) 122.
3 E. C. BATE-SMITH AND R. G. WESTALL, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 429.
4 A. E. BRADFIELD AND E. C. BATE-SMITH, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 441.
5 T. B. GAGE, C. D. DOUGLASS AND S. H. WENDER, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1582.
6 E. A. H. ROBERTS AND J. D. WOOD, *Biochem. J.*, 53 (1953) 332.
7 E. A. H. ROBERTS, R. A. CARTWRIGHT AND D. J. WOOD, *J. Sci. Food Agr.*, 7 (1956) 637.
8 C. S. HANES AND F. A. ISHERWOOD, *Nature*, 164 (1949) 1111.
9 D. P. BURMA, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 549.
10 D. G. ROUX, *J. Soc. Leather Trades' Chemists*, 39 (1955) 80.
11 F. E. KING AND W. BOTTOMLEY, *J. Chem. Soc.*, (1954) 1399.
12 K. FREUDENBERG AND D. G. ROUX, *Naturwiss.*, 41 (1954) 450.
13 T. SWAIN, *Chem. & Ind. (London)*, (1954) 1144 and personal communication.
14 D. G. ROUX AND S. R. EVELYN, *Biochem. J.*, 69 (1958) 530.
15 D. G. ROUX, *Nature*, 180 (1957) 973.
16 C. G. NORDSTROM AND T. SWAIN, *J. Chem. Soc.*, (1953) 2764.
17 S. R. EVELYN, *J. Soc. Leather Trades' Chemists*, 38 (1954) 142.
18 F. VIEBOCH AND C. BRECHER, *Ber.*, 63 (1930) 2818, 3207.
19 N. H. RAY, *Trans. Faraday Soc.*, 48 (1952) 809.
20 S. R. EVELYN, *J. Soc. Leather Trades' Chemists*, 38 (1954) 309.
21 H. SMITH, *Trans. Faraday Soc.*, 52 (1956) 402.
22 E. A. H. ROBERTS AND D. J. WOOD, *Biochem. J.*, 49 (1951) xxxiii.
23 T. A. GEISSMAN, in K. PEACH AND M. V. TRACEY, *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. III, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1955.
24 K. H. MEYER, *Melliand Textilber.*, 9 (1928) 573.
25 H. H. HODGSON, *J. Soc. Dyers Colourists*, 49 (1933) 213;
H. H. HODGSON AND F. P. HOLT, *J. Soc. Dyers Colourists*, 53 (1937) 175;
H. H. HODGSON AND E. MARSDEN, *J. Soc. Dyers Colourists*, 60 (1944) 210.
26 E. SCHRIM, *J. prakt. Chem.*, [2] 144 (1935) 69.
27 T. VICKERSTAFF, *J. Soc. Dyers Colourists*, 69 (1953) 279.
28 F. E. KING, J. W. CLARK-LEWIS AND W. F. FORBES, *J. Chem. Soc.*, (1955) 2948.
29 E. A. H. ROBERTS, *Chem. & Ind. (London)*, (1956) 737.
30 K. FREUDENBERG AND P. MAITLAND, *Ann.*, 510 (1934) 193.
31 K. FREUDENBERG AND K. WEINGES, *Ann.*, 590 (1955) 140.
32 D. E. HATHWAY AND J. W. T. SEAKINS, *Biochem. J.*, 67 (1957) 239.
33 E. C. BATE-SMITH AND T. SWAIN, *Chem. & Ind. (London)*, (1953) 377.
34 W. E. HILLIS, *Australian J. Biol. Sci.*, 9 (1956) 263.
35 D. G. ROUX, *Nature*, 180 (1957) 973.
36 D. G. ROUX, *Chem. & Ind. (London)*, (1958) 161.
37 R. H. PETERS AND H. H. SUMNER, *J. Soc. Dyers Colourists*, 71 (1955) 130.

Received April 9th, 1958

CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND DETERMINATION OF THIAMINE AND THIAMINE PHOSPHORIC ESTERS ON ION-EXCHANGE RESINS

L. DE GIUSEPPE AND G. RINDI
Institute of Human Physiology, University of Pavia (Italy)

INTRODUCTION

Thiamine and its mono-, di- and triphosphoric esters have been separated by paper chromatography employing different mixtures of solvents[1–8], by paper electrophoresis and by means of ion-exchange resins[6]. For such a separation on ion-exchange resins SILIPRANDI AND SILIPRANDI[6] used a weak cationic resin (Amberlite IRC 50), which, in the hydrogen form, allows TTP* to pass down, retards TDP and fixes TMP and T; consequently this procedure does not give a satisfactory separation of TTP and TDP.

We therefore developed a chromatographic method with the aim of obtaining a rapid, easy and complete separation of T and its mono-, di- and triphosphoric esters, which could be applied to biological materials.

EXPERIMENTAL

Principle

A mixture of T and its phosphoric esters was percolated through two superposed columns A and B (Fig. 1) containing a strong anion exchanger in the acetate and in the borate form respectively. TDP and TTP were retained in column A, while column B held TMP firmly and T very loosely. The elution of the substances was carried out with suitable eluents treating each column separately.

MATERIALS

Resin. Dowex-1,X-8, 200–400 mesh (Cl^-) (B.D.H.). The resin was submitted to the series of washings suggested by COHN[9], including the final one with concentrated HCl.

Preparation of the acetate form. A column of resin, purified as described above, was treated with 13% sodium acetate solution until the Cl^- reaction disappeared. The excess of the salt used was eliminated by thorough washing.

Preparation of the borate form. The resin (Cl^-) was treated, under the same conditions as above, with a 4.5% H_3BO_3 solution neutralized (pH 7–7.5) with concentrated NaOH, followed by careful washing with water.

* The following abbreviations have been used: T = Thiamine; TMP = Thiamine monophosphate; TDP = Thiamine diphosphate; TTP = Thiamine triphosphate.

References p. 551.

Thiamine. Thiamine hydrochloride (chloride)*.

TMP. Thiamine monophosphate (chloride)*

TDP. Thiamine diphosphate (chloride)*.

TTP. Thiamine triphosphates separated by column chromatography from a mixture of esters obtained by phosphorylation of T, according to VISCONTINI *et al.*[10]. The details of the method will be published elsewhere. The purity of each substance was checked by paper chromatography, according to SILIPRANDI AND SILIPRANDI[6].

Columns. The Pyrex glass tubes used (inner diam. 8 mm; height 80–90 mm) were fitted with a sintered glass disc, and fused to a ground glass stopcock. Suitable separatory funnels could be attached to the tubes by means of ground glass joints, which also joined the chromatographic tubes together (Fig. 1).

Size of the resin bed: 8 × 15 mm. *Flow rate*: 1 ml/75–90 sec.

METHOD

The columns A and B, containing the resin in acetate and borate form respectively, were superposed as shown in Fig. 1 so that the liquid flowing from A could pass into B.

0.1–2 mg of the mixture under examination, dissolved in a small volume of H_2O, was applied to column A and 24 ml of H_3BO_3 0.03 *M* were percolated through the columns without interruption. The boric acid readily displaced T, while it allowed TMP to remain fixed on column B and TDP and TTP on column A.

The columns were then separated in order to carry out further elution.

24 ml of 0.1 *M* NaCl in 0.1 *M* HCl were percolated through column B for the elution of TMP.

24 ml of 0.02 *M* sodium acetate in 0.04 *M* acetic acid to elute TDP, and 24 ml of 0.1 *M* HCl to elute TTP, were percolated in this order through column A.

Each fraction was collected in a 25-ml volumetric flask. 0.5 ml of 5 *M* HCl was added to the fractions containing T and TDP so that a final concentration of 0.1 *M* HCl was obtained in each flask.

All the volumes were brought to 25 ml with H_2O.

The optical density was measured at 270 mμ (isosbestic point)[11] in a Beckman spectrophotometer, Model DU, in silica cuvettes of 1 cm, against suitable blanks.

In order to check whether the proposed procedure of chromatographic separation allows a quantitative determination of the separated substances, some recovery assays were carried out.

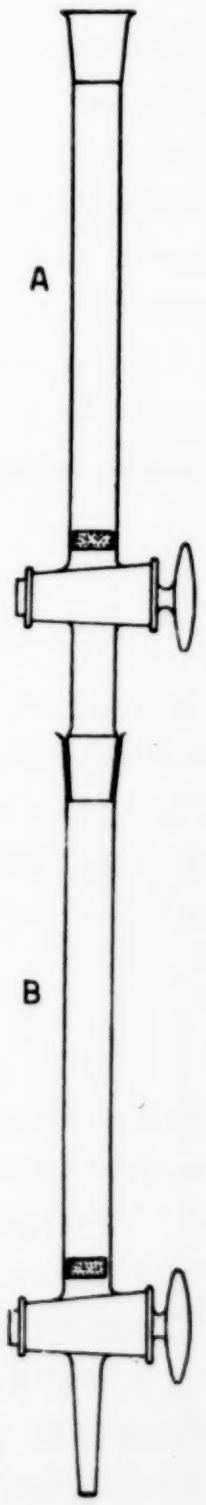


Fig. 1. Arrangement of the columns for the chromatography.

* The authors wish to thank Prodotti Roche, S.p.a., Milano, for the generous gift of these substances.

References p. 551.

TABLE I

RECOVERY OF T, TMP, TDP AND TTP APPLIED SINGLY ON THE COLUMNS AND CARRIED THROUGH THE WHOLE ANALYTICAL PROCEDURE

Added substance	*O.D$_{270}$ of the added solution*	*Eluent*	*O.D$_{270}$ of the eluted solution*	*Recovery %*
T	0.294	0.03 *M* H_3BO_3	0.280	95.2
		0.1 *M* NaCl in 0.1 *M* HCl	0.002*	—
		0.02 *M* Ac·ONa in 0.04 Ac·OH	0.002	—
		0.1 *M* HCl	0.000*	—
TMP	0.210	0.03 *M* H_3BO_3	0.002	—
		0.1 *M* NaCl in 0.1 *M* HCl	0.194*	92.3
		0.02 *M* Ac·ONa in 0.04 *M* Ac·OH	0.002	—
		0.1 *M* HCl	0.002*	—
TDP	0.238	0.03 *M* H_3BO_3	0.002	—
		0.1 *M* NaCl in 0.1 *M* HCl	0.003*	—
		0.02 *M* Ac·ONa in 0.04 *M* Ac·OH	0.230	96.6
		0.1 *M* HCl	0.001*	—
TTP	0.164	0.03 *M* H_3BO_3	0.000	—
		0.1 *M* NaCl in 0.1 *M* HCl	0.003*	—
		0.02 *M* Ac·ONa in 0.04 *M* Ac·OH	0.002	—
		0.1 *M* HCl	0.160*	97.5

* Corrected for the blank.

TABLE II

RECOVERY OF T, TMP, TDP AND TTP ADDED AS A MIXTURE

Mixture	*O.D$_{270}$**	*Eluent*	*O.D$_{270}$ of the eluted fractions*	*Recovery %*
T	0.147	0.03 *M* H_3BO_3	0.144	98
+				
TMP	0.109	0.1 *M* NaCl in 0.1 *M* HCl	0.099**	90.8
+				
TDP	0.115	0.02 *M* Ac·ONa in 0.04 *M* Ac·OH	0.110	95.6
+				
TTP	0.082	0.1 *M* HCl	0.080**	97.5
	0.453		0.433	95.8

* Optical density at 270 mμ of every constituent of the mixture before the chromatographic separation.

** Corrected for the blank.

In a first series of experiments the compounds were applied separately to column A and treated as described above. The results are shown in Table I.

In another series of assays, a suitable mixture of the four compounds was applied to column A and analysed as described under METHOD. The results are shown in Table II.

References p. 551.

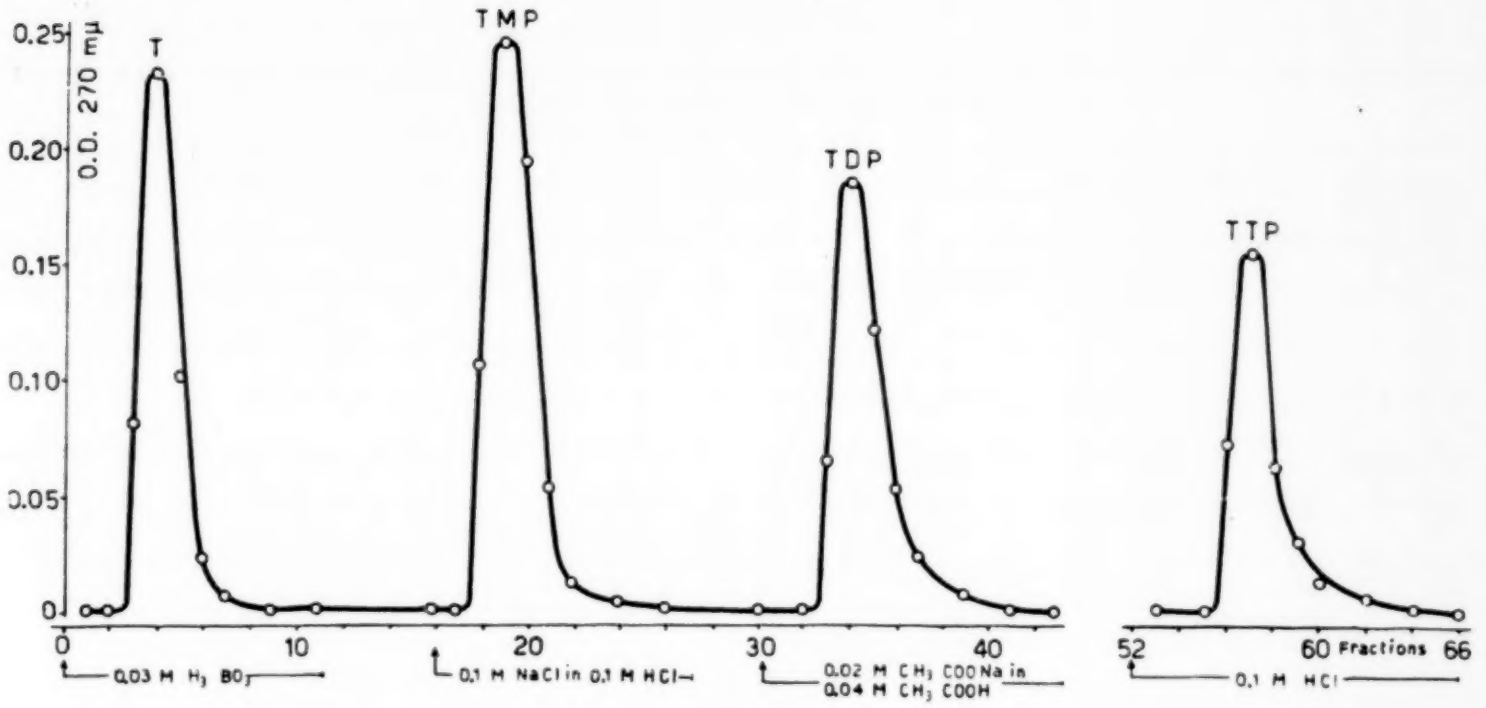


Fig. 2

Fig. 2. Separation of T, TMP, TDP and TTP. The solution applied contained: T 285 μg, TMP 270 μg, TDP 255 μg, TTP 275 μg, in a volume of 2 ml. Volume of the fractions: 1 ml. Readings made on the fractions tenfold diluted with 0.1 *M* HCl.

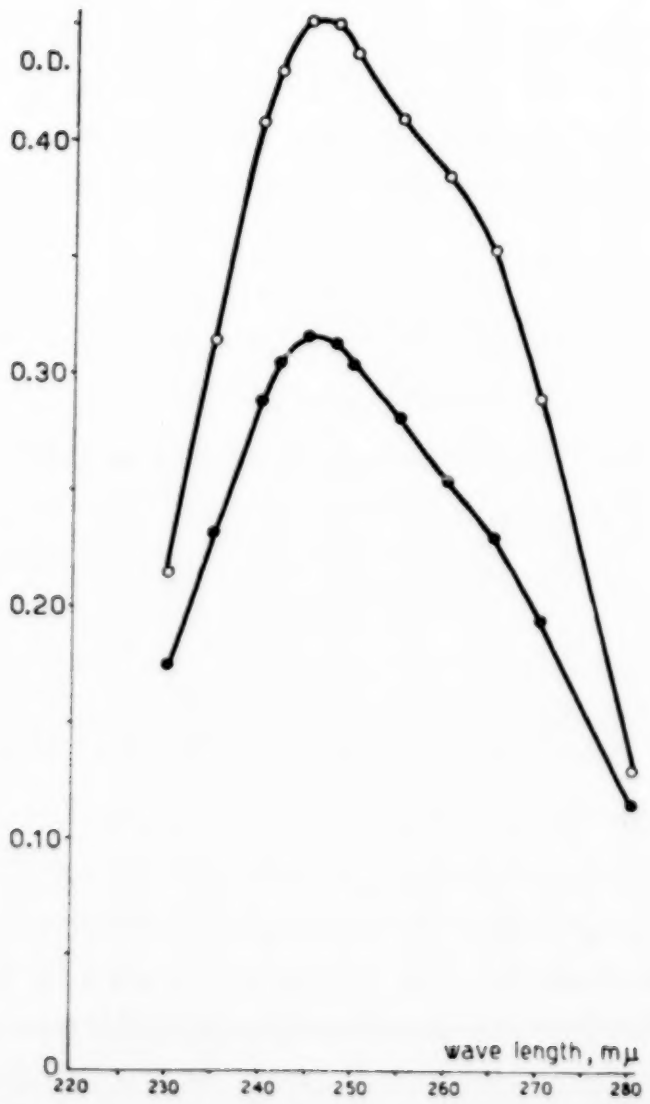


Fig. 3. Absorption spectra of the eluted T (•) and TDP (○) between 230–280 mμ.

References p. 551.

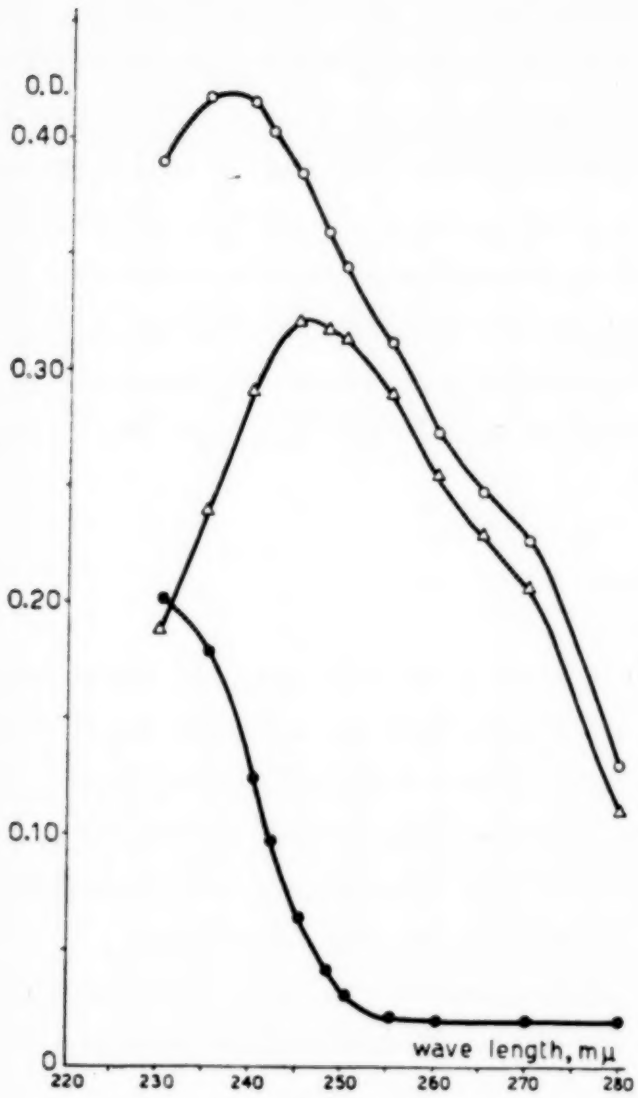


Fig. 4

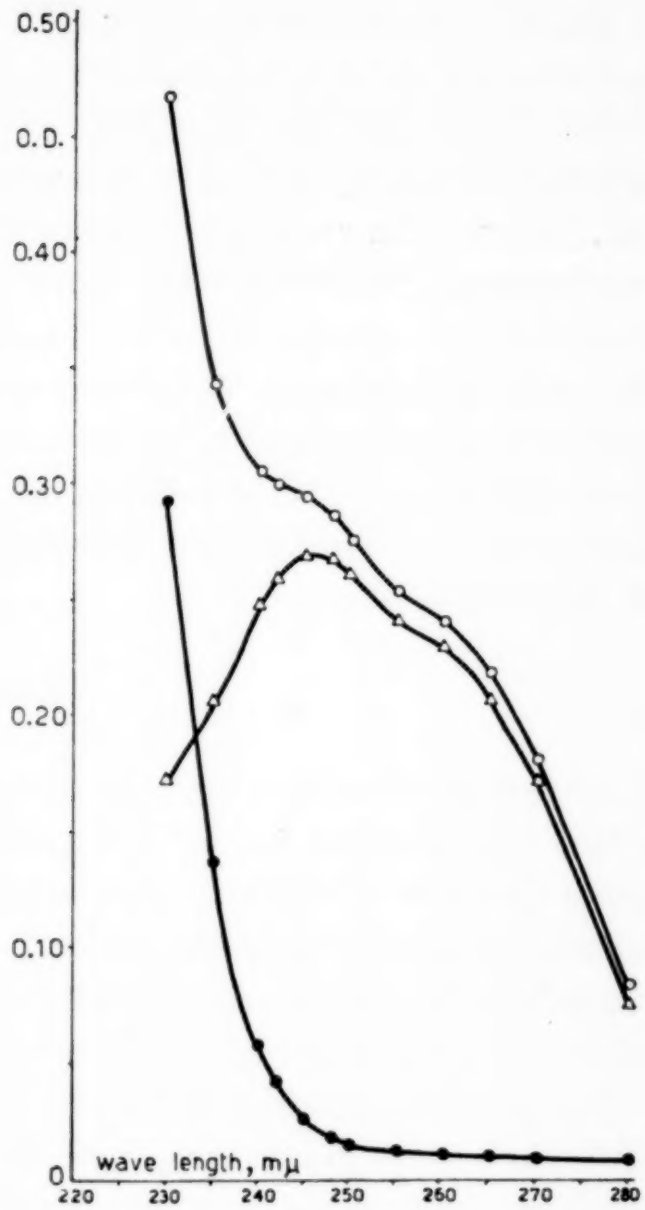


Fig. 5

Fig. 4. Absorption spectrum of TMP (△) between 230–280 mμ. The curve was obtained by deducting the O.D. values of the eluent, percolated through the column (•), from the corresponding O.D. values of the eluted TMP (○).

Fig. 5. Absorption spectrum of TTP (△) between 230–280 mμ. The curve was obtained by deducting the O.D. values of the eluent, percolated through the column (•), from the corresponding O.D. values of the eluted TTP (○).

RESULTS

The diagram in Fig. 2 shows that the separation of T and of its phosphoric esters, under the conditions described above, is sharp and efficient. The results in Table I show that the recoveries of the substances added separately are good, while the results in Table II show that the recoveries of the single components after chromatography of the mixture are of the same order as those obtained with the separate substances, indicating that the analytical procedure is practically quantitative.

Paper chromatography according to SILIPRANDI AND SILIPRANDI[6] of the separate eluted fractions, collected in the cold, lyophylized and taken up in 0.5 ml of HCl 0.05 *N*, showed the presence of a single consituent in each fraction.

Before lyophylization of the TMP fraction, centrifugation was necessary to remove a large amount of sparingly soluble H_3BO_3.

References p. 551.

The U.V. absorption spectrum of the eluates of each fraction was measured in the range between 230–270 mμ, using each eluent as a blank. As shown in Fig. 3, for the fractions T and TDP, the typical absorption spectrum of T was obtained with a maximum close to 245 mμ (pH = 1). However, for the TMP and TTP fractions this did not occur, because the respective eluents displaced not only the T esters, but also the anion bound to the resin (BO_3^{---} and CH_3COO^- respectively), which had a marked influence on the absorption in U.V. light measured against the eluent, as shown in Figs. 4 and 5. In order to obtain the typical T spectrum also for the TMP and TTP fractions, it is sufficient to use a blank obtained by percolating the eluents through a column without adsorbed T esters (Figs. 4 and 5, corrected). However, from the same figures it can be seen that the spectrophotometric measurement at 270 mμ is very little influenced.

DISCUSSION

The advantage of using a strongly anionic instead of a weakly cationic resin lies in the fact that with the former it is possible to fix and then to separate sharply the phosphoric esters of T, which have acid functions. When employing two superposed columns, the selectivity of the method can be increased by preparing the resin in a suitable form. This allows a preliminary separation of the substances, which on further elution with a suitable system of eluents can be made even more efficient.

For the determination of T and its esters in the separate eluates, the absorption in U.V. light at 270 mμ was measured. Similar results were obtained by measuring the thiochrome fluorescence after alkaline oxidation.

Obviously the transformation into thiochrome enhances both the sensitivity and the specificity of the method. This may constitute an important improvement for its application to biological materials, a point which we are now studying.

The method proposed for the separation of T and its mono-, di- and triphosphoric esters can be easily carried out and the time required for a complete analysis is about 3 hours.

While this manuscript was in preparation, SUZUOKI, YONEDA AND HORI[12], published a report in which the resin Dowex-1, X-10 (200–400 mesh) in the formate form, was used for the separation of the di-pentaphosphoric esters of T following the gradient elution technique.

SUMMARY

1. A method for the chromatographic separation of thiamine and its mono-, di- and triphosphoric esters on Dowex columns 1, X-8 (200–400 mesh) was studied, pure solutions being used.

2. The use of two columns containing the resin in borate and acetate form respectively proved to be particularly suitable for the preliminary separation of T and TMP from TDP and TTP.

3. The successive use of 0.03 *M* H_3BO_3 and 0.1 *M* NaCl in 0.1 *M* HCl allowed the elution of T and TMP, respectively, from the first column, while the elution of TDP and TTP was achieved by using 0.02 *M* Na acetate in 0.04 *M* acetic acid and 0.1 *M* HCl respectively.

4. The recoveries of the added substances amounted to 91–97%.

References p. 551.

REFERENCES

1 M. A. SPADONI AND G. TECCE, *Quaderni Nutriz.*, 11 (1950) 26.
2 M. VISCONTINI, G. BONETTI, C. EBNÖTHER AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 1384.
3 A. ROSSI FANELLI, N. SILIPRANDI AND P. FASELLA, *Science*, 116 (1952) 711.
4 K. H. KIESSLING AND G. LINDHAL, *Arkiv Kemi*, 6 (1953) 271.
5 W. BARTLEY, *Biochem. J.*, 56 (1954) 379.
6 D. SILIPRANDI AND N. SILIPRANDI, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 52.
7 E. GERLACH, E. WEBER AND H. J. DORING, *Arch. exptl. Pathol. Pharmakol., Naunyn-Schmiedeberg's*, 226 (1955) 9.
8 K. H. KIESSLING, *Acta Chem. Scand.*, 10 (1956) 1356.
9 W. COHN, in S. P. COLOWICK AND N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. III, Academic Press Inc., New York, 1955, p. 732.
10 M. VISCONTINI, G. BONETTI AND P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 32 (1949) 1478.
11 J. J. DOHERTY, N. CANE AND F. WOKER, *J. Pharm. and Pharmacol.*, 7 (1955) 1053.
12 J. SUZUOKI, M. YONEDA AND M. HORI, *J. Biochem. (Japan)*, 44 (1957) 783.

Received April 21st, 1958

SHORT COMMUNICATIONS

A simple device for the simultaneous development of several two-dimensional chromatograms

There are several methods of carrying out the ascending development of chromatograms. The simplest of them consists in immersing the rolled-up chromatogram in the solvent system placed on the bottom of the chamber[1]. DATTA, DENT AND HARRIS[2] described an apparatus for the vertical development of several chromatograms.

In our laboratory, a simple device has been constructed for the simultaneous ascending development of several chromatograms in a single chamber.

The device consists of a wooden cross-shaped stand, with glass rods fastened to the end of each of the four arms. These rods have sharp points and are parallel to one another (Fig. 1a). Short pieces of glass tube can be slipped on the rods between the chromatograms in order to prevent them from touching one another (Fig. 1b).

All the four corners of the paper squares are then perforated and the chromatograms are slid on the rods one by one, on both sides of the stand (Fig. 2a).

When the chromatograms are in place, four small supports made of glass, are fitted on the ends of the two lower rods; the purpose of these supports is to hold the stand upright and to prevent the lower edges of the chromatograms from bending (Fig. 2b).

The whole set-up is then placed in the glass development chamber containing the solvent system at the bottom (Fig. 3). After the chromatograms have been developed, the whole stand is removed from the chamber by means of a handle (Fig. 1c) and placed in the desiccator.

When a change of the direction of development is required, the stand is turned 90°, and one pair of supports is transferred to another rod (Fig. 4).

The device described above is especially useful in serial experiments, when it is essential to maintain identical conditions—such as size of chamber, saturation, temperature, duration of development etc.—throughout the experiment.

[1] F. CRAMER, *Papierchromatographie*, Verlag Chemie, G.m.b.H., Weinheim, 1953.
[2] S. P. DATTA, C. E. DENT AND H. HARRIS, *Science*, 112 (1950) 621.

Laboratory of Physiological Chemistry, School of Medicine, Lublin (Poland) T. BORKOWSKI
S. TROJNAR

Received April 23rd, 1958

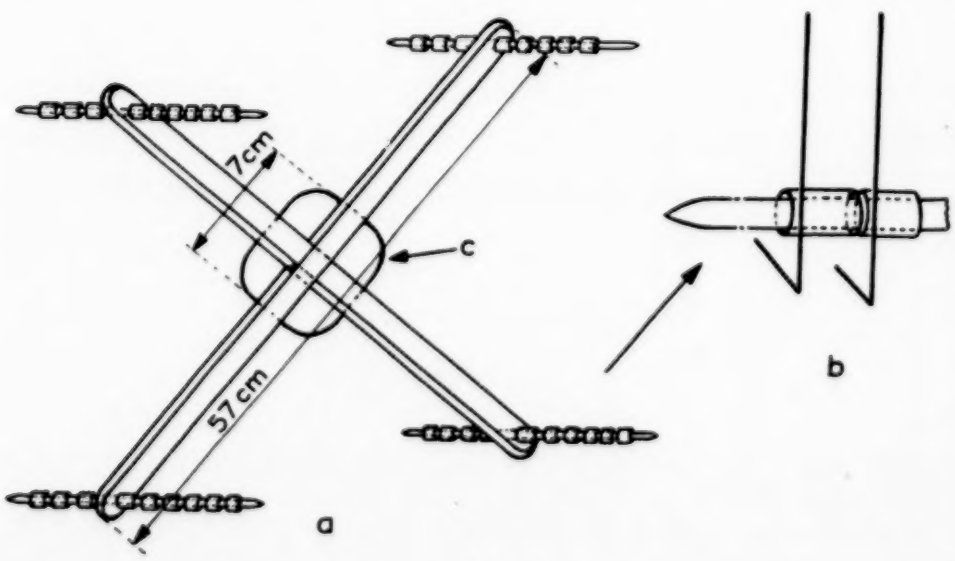


Fig. 1

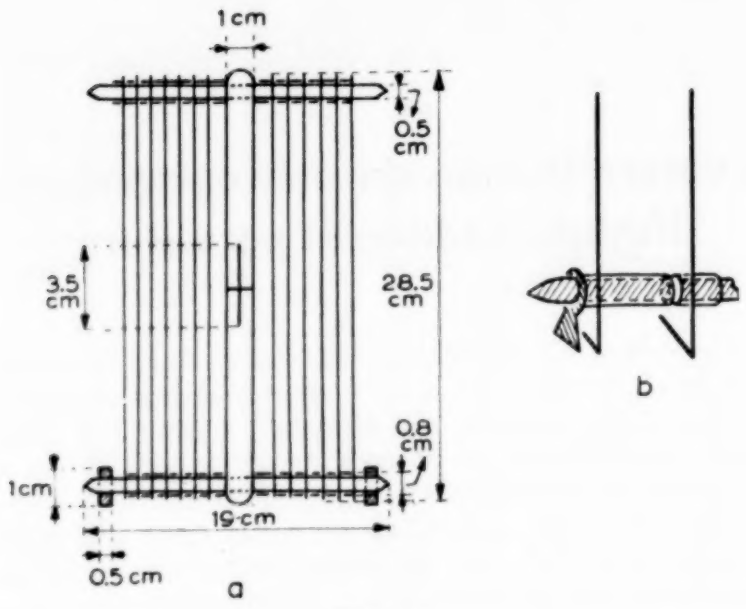


Fig. 2

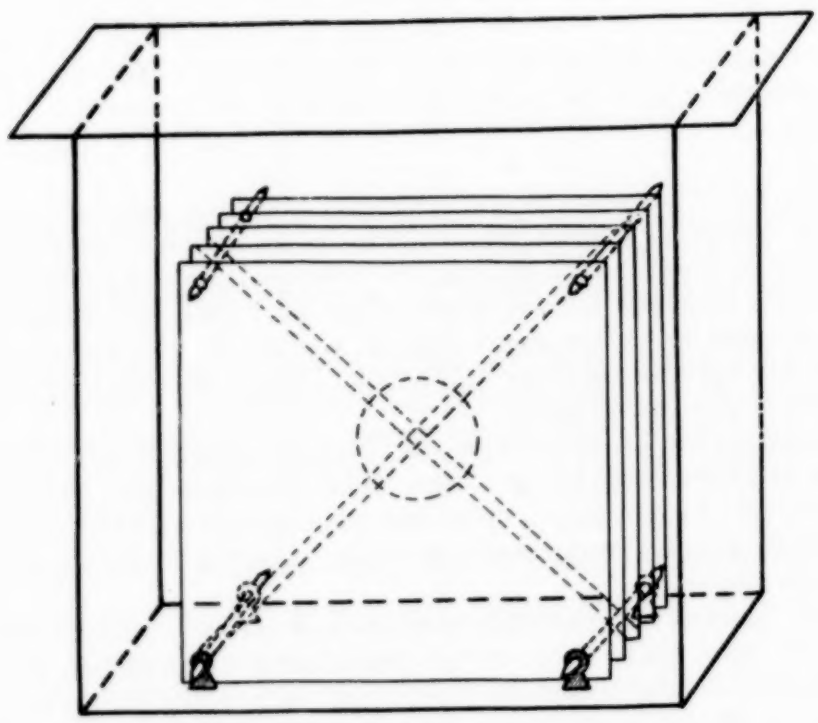


Fig. 3

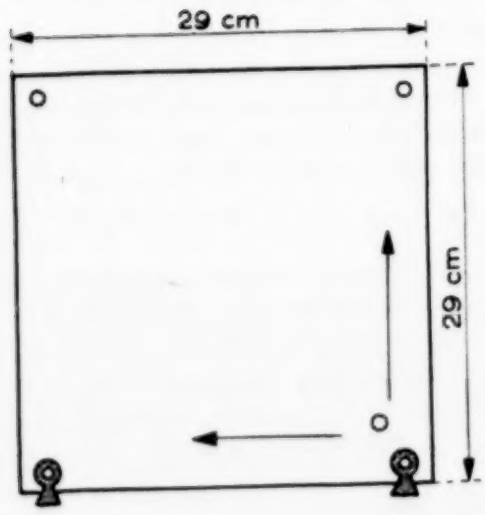


Fig. 4

Séparation et détermination chromatographique sur papier du lithium, sodium et potassium*

La séparation chromatographique sur papier du lithium, sodium et potassium a constitué l'objet d'un assez grand nombre de recherches. Dans ce but on a utilisé surtout les sels des acides minéraux[1-15]. Parmi les sels des acides organiques, BURMA[15] a étudié le comportement des citrates, ERLENMEYER *et al.*[16] celui des acétates et MAGEE ET HEADRIDGE[12] la chromatographie des *n*-butyrates. L'étude des circonstances expérimentales dans lesquelles on peut évaluer quantitativement les résultats a été faite assez rarement. On peut citer seulement les travaux de BEERSTECHER[2] et de ERLENMEYER *et al.*[17,18], qui ont recours à la mesure planimétrique des taches, et celui de TRISTRAM ET PHILLIPS[7], qui recommandent la microtitration; MAGEE *et al.*[4,12] apprécient les quantités d'ions alcalins par comparaison visuelle avec une série d'étalons.

Dans cette Note nous nous sommes proposé d'étudier la chromatographie des propionates de lithium, sodium et potassium. Cette tâche nous paraissait intéressante parce que la séparation des propionates alcalino-terreux peut être éffectuée avec succès en utilisant le mélange: ethanol absolu–eau–acide propionique–hydroxyde d'ammonium $d = 0.950$ (100:10:5:5), ainsi que nous l'avons montré[19,20]. Il s'agissait surtout de constater si le comportement des cations alcalins est le même que celui des cations alcalino-terreux, c'est à dire si la présence de l'ion NH_4^+ dans le développant est indispensable pour annihiler la formation des queues.

Partie expérimentale

Nous avons utilisé le papier Whatman No. 1. Ce papier contient une certaine quantité de calcium, magnésium et sodium, toutefois il peut être purifié de la manière décrite par POLLARD *et al.*[21].

De petites portions de solution (10 μl) ont été déposées sur des rectangles de papier (32.5 cm de hauteur, 10 à 20 cm de largeur), le long d'une ligne, de 2 en 2 cm, à une distance de 2.5 cm du bord inférieur. Les solutions de propionates étaient toutes décinormales; elles ont été préparées soit par la dissolution des carbonates dans de l'acide propionique, soit par échange d'ions sur une colonne d'Amberlite IRA-400 (propionate).

Après le séchage des taches on développe par chromatographie ascendante à une température de 20–21°, à l'aide du mélange: éthanol abs.–eau–acide propionique (100:10:1), sur une distance de 20 à 25 cm (6–7 heures). Le développement chromatographique étant accompli, les morceaux de papier étaient séchés à une température modérée, jusqu'à la disparition de l'odeur caractéristique de l'acide propionique.

Pour identifier les cations, le chromatogramme était arrosé avec une solution fraîche aqueuse d'acide violurique $N/10$, puis séché de nouveau par chauffage pendant 30 min à 50°, et 30 min à 100°, suivant les indications de ERLENMEYER[18]. Les taches des violurates alcalins étaient contournées au crayon, en regardant le chromatogramme contre la lumière sur un fond de verre blanc.

Les valeurs R_F ainsi obtenues sont: K 0.17; Na 0.31; Li 0.68. La séparation du propionate de sodium de celui de potassium est donc meilleure que celle des acétates correspondants, pour laquelle le facteur de séparation $R_{F\cdot Na}/R_{F\cdot K}$ a la valeur 1.24.

Pour les chromatogrammes effectués avec des mélanges qui contiennent une proportion plus élevée d'acide propionique, les valeurs R_F augmentent d'une manière régulière. Les taches des propionates alcalins sont nettement séparées, sans former des traînées. Ce comportement est donc tout à fait différent de celui des propionates alcalino-terreux, pour lesquels la présence de l'ion NH_4^+ ou Li^+ dans le développant est indispensable pour obtenir de bons résultats. Le remplacement de l'éthanol par un alcool à chaîne plus longue (par exemple, le propanol) dans une proportion identique (100 parts), ne présente pas d'avantages: les taches du Na et K deviennent beaucoup trop rapprochées (R_F: K 0.10; Na 0.14) et la formation des queues n'est pas diminuée pour les propionates alcalino-terreux.

La mesure planimétrique des taches obtenues après le développement chromatographique avec le mélange: éthanol abs.–eau–acide propionique (100:10:1) permet la détermination du Li, Na et K; l'erreur reste inférieure à 10%. La Fig. 1 présente le graphique des resultats obtenus. les coordonnées étant la quantité de cation (en micromoles) et la surface des taches (en mm^2). La hauteur jusqu'où a migré le front du solvant a été maintenue constante: 20 cm.

Le graphique démontre que le comportement des trois cations alcalins étudiés n'est pas le

* Dédié à la mémoire du Prof. R. CERNATESCU, membre de l'Académie de la R.P.R. (1894–1958).

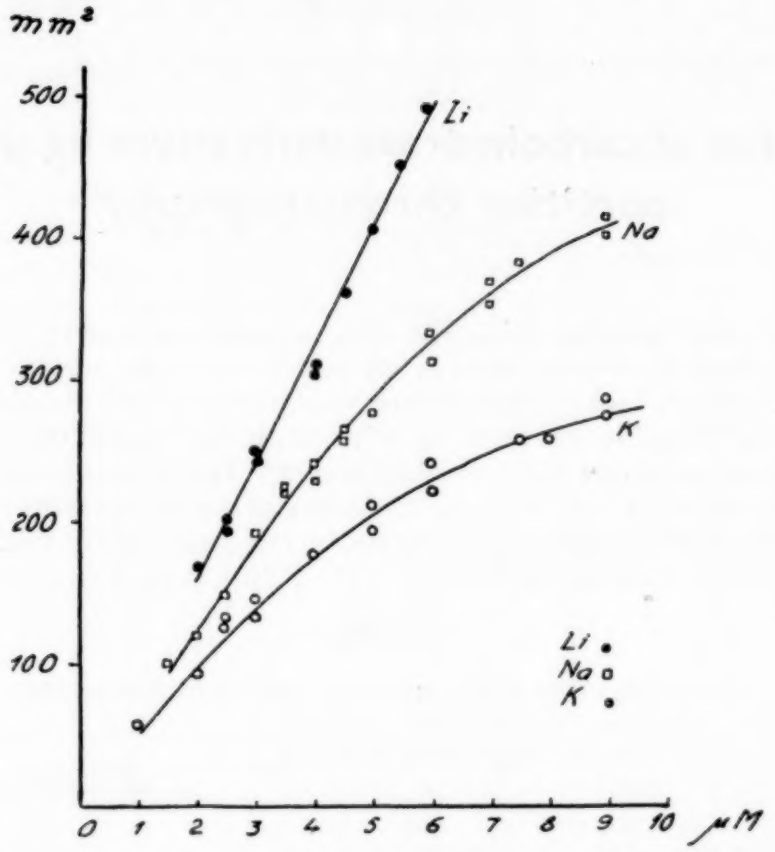


Fig. 1. Relation entre la quantité de Li, Na et K, et la surface des taches.

même, du point de vue de la relation entre la quantité du cation et la surface de la tache résultante. Pour le Li ces deux grandeurs sont proportionelles. Pour le potassium on obtient une ligne droite seulement en coordonées semi-logarithmiques. En ce qui concerne le Na, il occupe une position intermédiaire.

FISHER *et al.*[22] ont démontré que pour les amino-acides la surface des taches est proportionelle au logarithme des concentrations, relation qui, d'après BRIMLEY[23] est liée au phénomène de diffusion qui a lieu pendant la migration chromatographique. D'autre part, ERLENMEYER *et al.*[17] trouvaient pour les acétates de Li, Na, K, Mg et Ca une relation de proportionalité entre la surface de la tache et la concentration.

Institut de Chimie "Petru Poni", Académie de la R.P.R., Jassy (Roumanie) FLORIN MODREANU

[1] F. H. BURSTALL, G. R. DAVIES, R. P. LINSTEAD ET R. A. WELLS, *J. Chem. Soc.*, (1950) 516.
[2] E. BEERSTECHER, JR., *Anal. Chem.*, 22 (1950) 1200.
[3] S. CHAKRABARTI ET D. P. BURMA, *Sci. and Culture (Calcutta)*, 16 (1951) 485.
[4] C. C. MILLER ET R. J. MAGEE, *J. Chem. Soc.*, (1951) 3183.
[5] T. SAKAGUCHI ET H. YASUDA, *J. Pharm. Soc. Japan*, 71 (1951) 1469; *cf. C. A.*, 46 (1952) 3452i.
[6] T. BARNABAS, M. G. BADVE ET J. BARNABAS, *Naturwiss.*, 41 (1954) 478.
[7] D. R. TRISTRAM ET C. S. G. PHILLIPS, *J. Chem. Soc.*, (1955) 580.
[8] I. VAVRUCH ET M. HEJTMANEK, *Collection Czechoslov. Chem. Communs.*, 21 (1956) 1363.
[9] M. B. CELAP, *Bull. soc. chim. Belgrade*, 21 (1956) 225.
[10] H. T. GORDON ET C. A. HEWEL, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 1471.
[11] G. SOMMER, *Z. anal. Chem.*, 151 (1956) 336.
[12] R. J. MAGEE ET J. B. HEADRIDGE, *Analyst*, 82 (1957) 95.
[13] F. H. POLLARD, J. F. W. MCOMIE ET I. I. M. ELBEIH, *J. Chem. Soc.*, (1951) 446.
[14] I. I. M. ELBEIH ET M. A. ABOU-ELNAGA, *Anal. Chim. Acta*, 17 (1957) 397.
[15] D. P. BURMA, *Anal. Chim. Acta*, 9 (1953) 513.
[16] H. ERLENMEYER, H. VON HAHN ET E. SORKIN, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 1419.
[17] H. SEILER, E. SORKIN ET H. ERLENMEYER, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 120.
[18] H. SEILER, E. SORKIN ET H. ERLENMEYER, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 2483.
[19] FL. MODREANU, S. FISEL ET A. CARPOV, *Naturwiss.*, 44 (1957) 615.
[20] FL. MODREANU, S. FISEL ET A. CARPOV, *Studii cerc. ştiinţ., chim., Iaşi*, 1958 (sous presse).
[21] F. H. POLLARD, J. F. W. MCOMIE ET J. V. MARTIN, *Analyst*, 81 (1954) 353.
[22] R. B. FISHER, D. S. PARSONS ET G. A. MORRISON, *Nature*, 161 (1948) 764.
[23] R. C. BRIMLEY, *Nature*, 163 (1949) 215.

Reçu le 11 avril 1958

Separation of carbohydrate derivatives by gas-liquid partition chromatography*

Gas-liquid partition chromatography (G.L.P.C.)[1] has been used extensively for the qualitative and quantitative estimation of a wide variety of highly volatile organic compounds, *e.g.* acids[1], hydrocarbons, alcohols, esters[2]. Compounds of low volatility can also be analysed by this technique if they can readily be converted to derivatives with sufficient volatility. This has been illustrated by the separation of amino acids as their methyl esters[3]. The present communication reports, for the first time, the application of G.L.P.C. to the separation of carbohydrate derivatives. It was found that methyl ethers of the methyl glycosides of the heat-labile monosaccharides were sufficiently stable and volatile to be analysed by G.L.P.C. This report describes the separation of the

TABLE I

FULLY METHYLATED METHYL GLYCOPYRANOSIDES

Compound	*m.p. °C*	*b.p. °C*	$[\alpha]_D$	*Reference*
Methyl 2,3,4-tri-O-methyl-β-D-xylopyranoside	49.5–51.5		—69° (chloroform)	4
Methyl 2,3,4-tri-O-methyl-β-L-arabopyranoside	44.5–46.5		+253° (water)	5
Methyl 2,3,4-tri-O-methyl-α-L-arabopyranoside	45.5–47		+44° (water)	5
Methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-mannopyranoside		76–79 at 0.015–0.018 mm	+42° (water)	6
Methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-galactopyranoside		76–78 at 0.03 mm	+163° (water)	7
Methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-glucopyranoside		100 (bath temp.) at 0.1 mm	+151° (water)	8

fully methylated methyl glycopyranosides listed in Table I. These compounds were prepared by procedures in general use in carbohydrate chemistry and were purified by recrystallization to constant melting points or, for the syrupy products, by fractional distillation.

The observed physical properties recorded in Table I are in good agreement with those reported originally in the references listed. No hydroxyl bands were present in the infrared spectra of these compounds.

Separations of the fully methylated methyl glycopyranosides shown in Fig. 1, A and B, were obtained on a Podbielniak "Chromacon" (series 9475-3V) which was modified to take glass columns and to improve the pressure regulation, temperature control, injection and collection systems. An 8 ft., 7 mm internal diameter column, packed with Apiezon M: Celite 545 (1:4 w/w) prepared as described by JAMES AND MARTIN[9] was used. The operating temperature was 170°, helium was the carrier gas and a katharometer was used as detector. Table II lists the retention volumes of the fully methylated sugars relative to that of quinoline. Quinoline was chosen as a standard for this series because its retention volume was approximately midway between the pentose and hexose derivatives and because it is readily available in a pure form.

Fig. 1B shows the virtually complete separation of methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-mannopyranoside from methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-galactopyranoside. Fig. 1A shows the separation of methyl 2,3,4-tri-O-methyl-β-D-xylopyranoside, methyl 2,3,4-tri-O-methyl-β-L-arabopyranoside, methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-mannopyranoside, methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-glucopyranoside, and methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-galactopyranoside. In this run, the three hexose derivatives were only partially separated from each other; however, the separation is sufficient to enable quantitative estimation of these components after suitable calibration.

To establish that no structural changes occurred in the sugar molecules under the conditions

* Issued as N.R.C. No.4895.

TABLE II

RETENTION VOLUMES OF FULLY METHYLATED METHYL GLYCOPYRANOSIDES AT 170° RELATIVE TO QUINOLINE

Methyl 2,3,4-tri-O-methyl-β-D-xylopyranoside	0.528
Methyl 2,3,4-tri-O-methyl-β-L-arabopyranoside	0.785
Methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-mannopyranoside	1.468
Methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-glucopyranoside	1.594
Methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-galactopyranoside	1.708
Quinoline (standard)	1.000

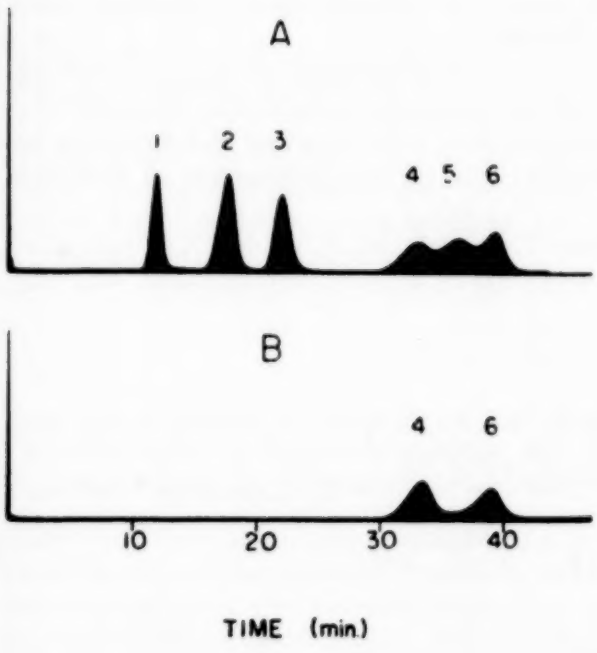


Fig. 1. Separation of fully methylated methyl glycopyranosides on a predominantly paraffin liquid phase. Column length, 8 ft.; stationary phase, Apiezon M vacuum stopcock grease; temperature 170°; flow rate, 130ml helium per minute; inlet gas pressure, 12 p.s.i.; detector at atmospheric pressure. Peaks in order of appearance: (1) methyl 2,3,4-tri-O-methyl-β-D-xylopyranoside, (2) methyl 2,3,4-tri-O-methyl-β-L-arabopyranoside, (3) quinoline (standard), (4) methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-mannopyranoside, (5) methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-glucopyranoside, (6) methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-galactopyranoside.

used, samples of the α and β-methyl glycosides of 2,3,4-tri-O-methyl-L-arabinose were collected from the effluent gas stream of two separate runs and crystallized. Mixed melting points of these with the original samples were not depressed showing that the products were unchanged. Under the conditions used the anomeric methyl glycosides of 2,3,4-tri-O-methyl-L-arabinose and of 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-galactose were not separated.

In view of the results reported above and from work in progress with other carbohydrate derivatives, it is felt that G.L.P.C. will be of considerable assistance in carbohydrate chemistry. Its main advantage lies in the much greater sensitivity and accuracy of quantitative data on very small quantities. A systematic program is now in progress on the separation of other carbohydrate derivatives and on the application of G.L.P.C. to elucidating structures of polysaccharides by separating the products formed by methanolysis of their methyl ethers.

Division of Applied Biology, National Research Council, Ottawa (Canada)

A. G. McINNES*
D. H. BALL*
F. P. COOPER
C. T. BISHOP

1 A. T. JAMES AND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 50 (1952) 679.
2 N. H. RAY, *J. Appl. Chem. (London)*, 4 (1954) 21.
3 E. BAYER, in D. H. DESTY, *Gas Chromatography* (preprints), Butterworths Scientific Publications, London, 1958, p. 231.
4 A. CARRUTHERS AND E. L. HIRST, *J. Chem. Soc.*, 121 (1922) 2299.
5 E. L. HIRST AND G. J. ROBERTSON, *J. Chem. Soc.*, 127 (1925) 358.
6 J. C. IRVINE AND A. M. MOODIE, *J. Chem. Soc.*, 87 (1905) 1462.
7 J. C. IRVINE AND A. CAMERON, *J. Chem. Soc.*, 85 (1904) 1071.
8 T. PURDIE AND J. C. IRVINE, *J. Chem. Soc.*, 83 (1903) 1021.
9 A. T. JAMES AND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 63 (1956) 144.

Received July 29th, 1958

* N.R.C. Post-doctorate Fellow 1956-58.

BOOK REVIEWS

Proceedings of the Congress on Modern Analytical Chemistry in Industry, University of St. Andrews, June 24th to 28th, 1957. Published for the Society for Analytical Chemistry by W. Heffer & Sons Ltd., Cambridge, England, 244 pp., price 2 gns.

This Congress was divided into three sections:

I. Analysis in Modern Industry
II. The Application of Some Newer Analytical Techniques in Industry
III. Developments in Analysis for New Problems in Industry

containing altogether 23 papers. Few of these do not mention some application of chromatographic techniques to some special problem. Three of them deal more specifically with the applications of chromatography:

Recent Progress in Separating Substances of High Molecular Weight, by R. L. M. SYNGE, discusses chromatography, counter current distribution, electrophoresis, centrifugation and diffusion as well as ultrafiltration in the fractionation of polymers.

Analysis in Medical Research, by A. T. JAMES, presents several examples of the application of paper chromatography, column partition and gas liquid chromatography from the work of the author. Clinical chemists will be amazed to see that it is now possible to analyse the mixture of fatty acids from biological sources (*e.g.* rabbit sebum) with as little as one milligram of starting substance available.

The Application of Gas Chromatography in the Petroleum Industry, by A. I. M. KEULEMANS, discusses such problems as "Trouble shooting" during the start-up of a commercial plant and the use of continuous analysers for gas chromatography.

Each paper is followed by a discussion.

The reviewer is sorry to note that only a list of members, but no subject or author index had been prepared.

M. LEDERER (Arcueil)

Ion Exchangers in Organic and Biochemistry, edited by C. CALMON AND T. R. E. KRESSMAN. Interscience Publishers, Inc., New York and London, 1957, 761 pages, price $ 15.00 or 120 s.

In the last decade it was publicly divulged that chemists on the wartime Manhattan Project had succeeded in solving an old problem—the rapid and clear-cut separation of rare earth elements. Their unprecedented success was accomplished by the use of synthetic ion exchange resins in combination with complexing agents. The repercussions of this event were felt immediately in biochemistry and resulted in several notable developments as exemplified by extraordinarily effective separations of amino acids, nucleic acids, carbohydrates, enzymes, viruses, and numerous other applications which have expanded the horizons of biochemistry.

Now a nearly 800 page book is devoted to the applications of ion exchange in biochemistry and medicine. An index of the amazing growth of the field is the fact that this book is more a survey than a detailed treatment.

The knowledgeable editors of this book have made an excellent choice of collaborators who, without exception, are among the most qualified people in the respective fields. The first 200 pages of the book consist of nine clearly written chapters on the principles of ion exchange and the techniques and apparatus. These chapters should prove especially valuable to the non-specialist who is interested in the latest views on the mechanism of action of ion exchangers, their preparation and properties, and many other aspects which help to explain the specific applications in the third section of the book.

The editors have not restricted the scope of the book to ion exchangers as such but have included chapters on the ion exchanging properties of tissues, cells, or bacteria, and the consequences of such properties to metabolism.

It has been said that this book was written by specialists for non-specialists. With this assessment the reviewer agrees. He would add though that the specialist will find it very useful and suggestive.

J. SCHUBERT (Argonne National Laboratory)

Research in Ion-Exchange Chromatography (Transactions of the Session on applications of ion-exchange chromatography in medicine and the food industries), Academy of Sciences of the U.S.S.R., Division of Chemical Sciences, Commission on Chromatography (Original Russian Text published by Academy of Sciences U.S.S.R. Press, Moscow, 1957).
IN ENGLISH TRANSLATION, Consultants Bureau Inc., 227 West 17th Street, New York 11, N.Y., 180 pp., price $ 35.00.

This volume, translated by the Consultants Bureau Inc., contains a series of papers whose titles are already familiar to most English readers from abstracting journals. Hence the reviewer will concern himself solely with the translation and not with the subject matter of the translated papers.

On the whole the translation is good and contains relatively few printing errors (such as quine sulfate instead of quinine sulfate on page 156).

However, the presentation of references is not very successful. The editors appear to have contented themselves with translating names from the Russian using a set code, thus not taking into consideration that many names have been first translated from English into Russian. Hence it happens that A. J. P. Martin becomes A. I. P. Martin and Nachod becomes Nakhod although one could expect a translator of chromatographic articles to be familiar with these names.

The reviewer remarked that numerous Russian translations of American and English books are amongst the references. Surely these would not interest the reader of a translation, who would prefer to consult directly the original. The reviewer would further suggest that when Russian books, *e.g.* GRINBERG, are quoted, the existence of a western language translation (in this case German) should be mentioned.

Fundamentals of Chromatography, by H. G. CASSIDY. *Technique of Organic Chemistry*, Vol. X, edited by A. WEISSBERGER. Interscience Publishers, New York, 1957, 447 pp., price $ 9.75.

Nachdem sich Professor CASSIDY im 5. Band der bekannten Reihe von Monographien über die Technik der organischen Chemie bereits einmal, im Rahmen einer allgemeinen Besprechung der Adsorption, mit der Chromatographie befasst hatte, widmet er sich im 10. Band ausschliesslich und ausführlich dem Thema der Grundlagen der Chromatographie. Dem Inhalt des Buches nach zu schliessen, meint CASSIDY mit dem Begriffe "fundamental" sowohl die allgemeine Theorie und die Prinzipien, die den verschiedenen Formen der Chromatographie zugrundeliegen, als auch alles das, was dem Uneingeweihten, dem naiven Adepten behilflich sein kann, wenn er seine ersten chromatographischen Versuche anstellt. Einerseits wird die Theorie der chromatographischen Prozesse gründlich und in breiter Darstellungsweise, in engster Anlehnung an die auf diesem Gebiete verdienten Autoren, mit den von diesen jeweils gewählten Symbolen und, vor allem im Falle A. J. P. MARTINS, seitenweise im Originalwortlaut wiedergegeben; andererseits finden sich eingehende Schilderungen auch einfachster praktischer Operationen, bis zu banalen Anweisungen (wie beispielsweise jener auf Seite 387, dass es vor Beginn der chromatographischen Auftrennung einer Mischung ratsam ist, sich zu vergewissern, dass die Substanz, die man sucht, in der Mischung auch wirklich vorhanden ist).

Den Begriff Chromatographie fasst CASSIDY ungewöhnlich weit, so dass neben den zahlreichen Arten der Verteilungs- und Adsorptionschromatographie, neben Trennungen auf Ionenaustauscher- und Elektronenaustauschersäulen sogar auch der Fraktionierung durch Zerschäumung ein eigenes Kapitel zugedacht ist. Die Liste der Anwendungsbeispiele für die chromatographischen Methoden will keinen Anspruch auf Vollständigkeit und kann keinen Anspruch auf Systematik oder Ausgewogenheit erheben. Es ist jedoch nicht zu bestreiten, dass das Buch, in dem laut Literaturverzeichnis mehr als 1000 Originalveröffentlichungen verarbeitet sind, eine Fülle wertvoller und anregender Informationen vermittelt und reichlich Stoff zur Überlegung bietet.

H. TUPPY (Wien)

Papierchromatographie, von FRIEDRICH CRAMER, 4. Auflage, Verlag Chemie, GMBH, Weinheim, 1958, 215 Seiten, 91 Abb., 8 Farbtafeln, Halbl. DM 21.—.

Die *Papierchromatographie* von CRAMER erschien 1952 als 81 Seiten starke Monographie mit dem Ziel, dem Chemiker eine "methodische Anweisung zur Ausführung papierchromatographischer Trennungen" in die Hand zu geben. Heute liegt die vierte, 215 Seiten umfassende Auflage vor.

Das Buch gliedert sich in zwei Hauptteile, deren erster die Erläuterung der Arbeitsmethodik (49 Seiten) und allgemeine Angaben über quantitative und präparative Papierchromatographie sowie eine Übersicht über papierelektrophoretische Techniken enthält. Im zweiten, speziellen Teil (116 Seiten) wird die Papierchromatographie bestimmter Stoffgruppen besprochen (Aminosäuren, Zucker, Alkohole, Phosphorsäureester, Nukleinsäure-Spaltprodukte, Phenole, organische Säuren und Basen, Alkaloide, Vitamine, Steroide, Farbstoffe, anorganische Verbindungen usw.).

Der methodische Teil bringt eine Beschreibung der benötigten Geräte, der Papiersorten, einiger Lösungsmittel und des prinzipiellen Ganges der papierchromatographischen Analyse und gibt dem Leser einen guten Überblick über die technischen Voraussetzungen einer erfolgreichen Trennung.

Im zweiten Teil findet der Leser eine Besprechung geeigneter Lösungsmittel und Sprühreagentien, sowie Angaben über die Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung der Stoffklassen. Da das Buch die begrüssenswerte Tendenz hat, die wesentlichen Vorschriften direkt abzudrucken, um dem Benutzer das Lesen der Originalliteratur zu ersparen, sollte besonderer Wert darauf gelegt werden, möglichst nur bewährte Methoden und Nachweisreagentien anzuführen.

In dieser Hinsicht zeigt das Buch erfreuliche Ansätze. Man kann sich aber, da die Papierchromatographie eine Hilfswissenschaft ist, wohl fragen, ob *ein* Autor auf allen Teilgebieten genügend experimentelle Erfahrungen hat, um aus eigener Kenntnis nur die verlässlichen Methoden aufzuführen. Das Vielmännerbuch über Papierchromatographie muss noch geschrieben werden! Der Referent eines solchen Buches steht im Grunde vor derselben Schwierigkeit, da auch er nur das beurteilen kann, was er praktisch ausprobiert hat, sodass sich seine Anregungen auch nur auf bestimmte Stoffklassen beschränken können.

Bei der Entsalzung von Aminosäurelösungen lässt sich der Verlust von Arginin und Lysin vermeiden, wenn man statt des basischen einen sauren Austauscher verwendet, an dem nur Taurin und Cysteinsäure unabsorbiert bleiben. Bei der Vielzahl der Aminosäuren interessieren besonders spezielle Reagentien, ausser den angeführten solche für schwefelhaltige Aminosäuren und Tyrosin. Die Blausäure im Phenol lässt sich gut durch Cupron ersetzen. Die Papierchromatographie der DNP-Aminosäuren sollte, besonders bei nachfolgender quantitativer Bestimmung, unter Lichtausschluss durchgeführt und Dinitrophenol vor der Trennung durch Sublimation weitgehend entfernt werden. Unausgewogen erscheint dem Referenten die Gestaltung des Kapitels "Konstitutionsermittlung von Proteinen und Peptiden". So hat beispielsweise die Desaminierung zur Ermittlung der Amino-Endgruppe heute nur noch historisches Interesse und ist durch bessere Methoden verdrängt worden (SANGER, EDMAN). Zu begrüssen wären einige Angaben über die Phenylisothiocyanat-Methode und über Verfahren zur Charakterisierung der Carboxyl-Endgruppe (Carboxypeptidase; AKABORI). Die Beschreibung des prinzipiellen Vorgehens von SANGER bei der Sequenz-Bestimmung des Insulins ist etwas zu knapp gefasst und berücksichtigt vornehmlich ältere Arbeiten.

Bzgl. der Nachweisreagentien für Zucker mag hier auf das Verfahren von VISCONTINI (Perjodat, Benzidin) und die quantitative Bestimmung mit Anilinphthalat (BAAR) hingewiesen werden.

Ein Buch über Papierchromatographie sollte, besonders wenn es sich an Benutzer wendet, die sich in die Methode einarbeiten wollen, wo immer möglich den Leser zur kritischen Beurteilung der Ergebnisse (Identität von Substanzen, Fehlerbreite quantitativer Bestimmungsmethoden) zu erziehen versuchen. Begrüssenswert wäre es, wenn diese an und für sich vorhandene Tendenz noch konsequenter durchgeführt würde.

Dass der "CRAMER" jetzt in der vierten Auflage vorliegt, darf als Beweis dafür angesehen werden, dass das Werk viele Leser gefunden hat, und der Referent bekennt, dass auch er das Buch oft mit Erfolg zu Rate gezogen hat. Einige Druckfehler in den Literaturzitaten lassen sich sicher in einer folgenden Auflage korrigieren.

B. KICKHÖFEN (Freiburg i. Br.)

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY VOL. 1 (1958)

AUTHOR INDEX

BAKER, C. G., see MOORE, T. B.
BALL, D. H., see MCINNES, A. G.
BARROLLIER, J., J. HEILMANN AND E. WATZKE 434
BECK, A., see KERTES, A. S.
BEN-BASSAT, A. H. I., see KERTES, A. S.
BERMES, JR., E. W., see MCDONALD, H. J.
BISHOP, C. T., see MCINNES, A. G.
BONAVITA, V. AND V. SCARDI 285
——, see SCARDI, V.
BORKOWSKI, T. AND S. TROJNAR 552
BRESLER, A. E., see WHITEHOUSE, M. W.
CASINOVI, G. C., see MARINI-BETTÒLO, G. B.
CHARTIER, J., F. W. VAN KLAVEREN AND G. VAILLANCOURT 317
CHEMLA, M. 2
COCH-FRUGONI, J. A. 90
——, see MARINI-BETTÒLO, G. B.
COOPER, F. P., see MCINNES, A. G.
COULSON, C. B. AND W. C. EVANS 374
CRAWFORD, R., see EDWARD, J. T.
DE GIUSEPPE, L. AND G. RINDI 545
DEMOLE, E. 24
DIETRICH, P. AND D. MERCIER 67
DOLÉNEK, A., see KUBÍČEK, R.
DUYCKAERTS, G., see MOUSSEBOIS, C.
EDWARD, J. T. 446
——, AND R. CRAWFORD 449, 521
EVANS, W. C., see COULSON, C. B.
EVELYN, S. R., see ROUX, D. G.
FARMILO, C. G., see NADEAU, G.
FISET, L., see NADEAU, G.
GIL-AV, E., J. HERLING AND J. SHABTAI 508
GUEDES DE CARVALHO, R. A., see NUNES DA COSTA, M. J.
GUILLAUME, J., see OSTEUX, R.
HAAVALDSEN, L., see JONSEN, J.
HARBORNE, J. B. 473
HARBOTTLE, G., see JACH, J.
HARTEL, J., see RITTER, F. J.
HEILMANN, J., see BARROLLIER, J.
HERLING, J., see GIL-AV, E.
HETTLER, H. 389
HÜLSEN, W. 91
JACH, J., H. KAWAHARA AND G. HARBOTTLE 501
JAKOVAC, Z. AND M. LEDERER 289
JONSEN, J., L. HAAVALDSEN AND S. LALAND 291
KAWAHARA, H., see JACH, J.
KEITH, R. W., D. LE TOURNEAU AND D. MAHLUM 534
KERTES, A. S. 62
—— AND A. BECK 496
—— AND A. H. I. BEN-BASSAT 489
KUBÍČEK, R. AND A. DOLÉNEK 266
LALAND, S., see JONSEN, J.
LATURAZE, J., see OSTEUX, R.
LEDERER, M. 86, 172, 279, 314
——, see JAKOVAC, Z.
LE TOURNEAU, D., see KEITH, R. W.
LINSKENS, H. F. 202, 472
LISSITZKY, S., see VIGNE, J.
LOOMEIJER, F. J. AND G. M. LUINGE . . 179
LOVELOCK, J. E. 35
LUINGE, G. M., see LOOMEIJER, F. J.
MCDONALD, H. J., L. V. MCKENDELL AND E. W. BERMES, JR. 259
MCINNES, A. G., D. H. BALL, F. P. COOPER AND C. T. BISHOP 556
MCKENDELL, L. V., see MCDONALD, H. J.
MAHLUM, D., see KEITH, R. W.
MANN, C. K. 386
MARINI-BETTÒLO, G. B. AND G. C. CASINOVI 411
—— AND J. A. COCH-FRUGONI 182
MERCIER, D., see DIETRICH, P.
MICHL, H. 93
MODREANU, F. 554
MOORE, T. B. AND C. G. BAKER 513
MOUSSEBOIS, C. AND G. DUYCKAERTS . . 200
MUNIER, R. 524
NADEAU, G., G. SOBOLEWSKI, L. FISET AND C. G. FARMILO 327
NEHER, R. 122, 205
NUNES DA COSTA, M. J. AND R. A. GUEDES DE CARVALHO 47
OSTEUX, R., J. GUILLAUME AND J. LATURAZE 70
PERSSON, A. 269
PICKERING, W. F. 274
REIO, L. 338
RINDI, G., see DE GIUSEPPE, L.
RITTER, F. J. AND J. HARTEL. 461
ROUX, D. G. AND S. R. EVELYN 537
SCARDI, V. AND V. BONAVITA 287
——, see BONAVITA, V.
ŠESTÁK, Z. 293
SHABTAI, J., see GIL-AV, E.
SHUKLA, S. K. 457
SOBOLEWSKI, G., see NADEAU, G.
SORU, E. 380
STAPLE, E., see WHITEHOUSE, M. W.
TROJNAR, S., see BORKOWSKI, T.
VAILLANCOURT, G., see CHARTIER, J.
VAN KLAVEREN, F. W., see CHARTIER, J.
VERNOIS, J. 52
VIGNE, J. AND S. LISSITZKY 309
WATZKE, E., see BARROLLIER, J.
WHITEHOUSE, M. W., A. E. BRESLER AND E. STAPLE 385
WIEME, R. J. 166
ZAITLIN, M. 186

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY VOL. 1 (1958)

SUBJECT INDEX

Acids, organic, examination by high voltage electrophoresis 114
——, volatile aliphatic, separation by paper chromatography 70
Aglycones, adsorption chromatography . 148
——, paper chromatography 244
——, partition chromatography 161
Alcohols, cyclic, examination by high voltage electrophoresis 111
——, polyvalent, examination by high voltage electrophoresis 108
Alkaloids, examination by high voltage electrophoresis 116
——, separation of curare —— 411
——, separation of *Strychnos* —— . . . 411
——, separation and identification of —— from opium by partition chromatography on paper 327
Alumina, storage and behaviour in chromatography 271
Amines, biogenic, examination by high voltage electrophoresis 107
Amino acids, analysis by horizontal paper chromatography 317
——, examination by high voltage electrophoresis 103
——, quantitative determination 434
Ammonium ions, aliphatic, calculation of the zone mobilities in paper electrophoresis 449
Anthocyanin pigments, chromatographic identification 473
Apparatus, for continuous automatic registration of radioactivity of paper chromatograms 309
——, for high voltage electrophoresis . . 95
——, portable, for paper electrophoresis 182
——, for tracing the extinction curves of chromatograms and pherograms . . 434
Bacteria, application of circular paper chromatography to the differentiation of —— by enzymic tests 380
Bile acids, adsorption chromatography . . 149
——, paper chromatography 248
——, partition chromatography 164
Borates, chromatographic behaviour. . . 47
Boromolybdates, chromatographic behaviour 50
Borotungstates, chromatographic behaviour 49
Carbohydrate derivatives, separation by gas-liquid partition chromatography 556
Carbohydrates, examination by high voltage electrophoresis 108
Cation mixtures, separation by chromatography on paper impregnated with ion-exchange resins 314
Centrifugally accelerated paper chromatography, fundamental aspects 259
Chloroplast pigments, paper chromatography. 293
Chromatograms, simultaneous development of several two-dimensional —— 552
Chromatostrips, microchromatography using —— 24
Citric acid, used as electrolyte in the paper electrophoretic separation of rare earths 86
Curare alkaloids, separation 411
Densitometer, description of —— for direct colorimetry of irregularly shaped chromatographic spots 166
Detector, sensitive, for gas chromatography. 35
Equilibration, correlation of ion-exchange column and —— experiments under non-ideal conditions 386
Esterase, detection by paper chromatography. 202
Extinction curves, apparatus for tracing —— of chromatograms and pherograms 434
"Flavonoids", correlation between structure and paper chromatographic behaviour 537
Gas chromatography, in radiochemistry 200
——, sensitive detector for 35
Glycosides, adsorption chromatography 148
——, paper chromatography 244
——, paper chromatography and paper electrophoresis 374
——, partition chromatography 161
High voltage electrophoresis 93
Inorganic adsorption paper chromatography. 274
Inorganic ions, examination by high voltage electrophoresis 117
Iodine, microdetermination 91
——, use for the detection of lipids . . . 385
Ion-exchange column, correlation of —— and equilibration experiments under non-ideal conditions 386
Ion-exchange resins, separation of cation mixtures by chromatography on paper impregnated with —— . . . 314
Isotopes, separation 2
Ketosteroids, qualitative, quantitative and preparative chromatography . . . 461
Light Green, suitability as a stain for the quantitative evaluation of proteins in paper electrophoresis 285
Lipids, use of iodine for detection 385
Lithium, paper chromatographic separa-

tion and determination of ——, sodium and potassium 554
Methylenecyclohexane, gas-liquid partition chromatography of mixtures of —— and the isomeric methylcyclohexenes 508
Microchromatography, using chromatostrips 24
Mould metabolites, separation and identification by paper chromatography 338
Nigrosine, stain for quantitative estimation of serum proteins in paper electrophoresis 287
Nitrates, metallic, in paper chromatography 62, 489, 496
Nucleosides, examination by high voltage electrophoresis 111
Nucleotides, examination by high voltage electrophoresis 111
Obstructive factor, in paper electrophoresis 446
Oestrogens, adsorption chromatography . 147
——, paper chromatography 232
——, partition chromatography 161
Opium, separation of —— alkaloids by partition chromatography on paper . . 327
Paper chromatography, fundamental aspects of centrifugally accelerated —— 259
Peptides, examination by high voltage electrophoresis 105
——, calculation of the zone mobilities of —— from their diffusion coefficients 521
——, R_F values of several synthetic —— 513
Phenol derivatives, separation and identification by paper chromatography 338
Phenols, paper chromatography and paper electrophoresis 374
——, quantitative paper-chromatographic determination 534
Phenylalanine, quantitative analysis of —— content of a radioactive protein by paper chromatography 524
Phosphorus compounds, inorganic, paper chromatography 389
Potassium, paper chromatographic separation and determination of ——, lithium and sodium 554
Protactinate ion, chromatographic evidence for its existence 289
Protactinium, paper chromatography 52, 172
Proteins, examination by high voltage electrophoresis 106
——, suitability of Light Green as a stain for the quantitative evaluation of —— in paper electrophoresis . . . 285
Purines, examination by high voltage electrophoresis 111
Pyrazine bases, volatile, separation by gas-liquid chromatography 67
Pyrazine-carboxylic acids, separation by paper chromatography 67
Pyrimidine deoxyribosides and deoxyribotides, detection on paper chromatograms 291
Radioactive products, application of paper electrophoresis to the separation of —— found in the Szilard-Chalmers reaction 501
Radioactivity of paper chromatograms, apparatus for continuous automatic registration 309
Radio chromatograms and pherograms, measuring apparatus for 471
Rare earths, separation by paper electrophoresis 86
Rhodium (III) complexes, study by paper electrophoresis and ion-exchange chromatography 279, 457
Salicin, determination by paper chromatography 269
Sapogenins, adsorption chromatography . 148
——, paper chromatography 247
Saponins, paper chromatography 247
Serum proteins, nigrosine as a stain for quantitative estimation of —— in paper electrophoresis 287
Sodium, paper chromatographic separation and determination of ——, lithium and potassium 554
Steroids, adsorption chromatography . . 140
——, paper chromatography 232
——, partition chromatography 160
——, qualitative, quantitative and preparative chromatography 461
——, weakly polar, paper chromatography 179
Steroid conjugates, adsorption chromatography 149
——, paper chromatography 248
Sterols, adsorption chromatography . . . 139
——, paper chromatography 231
——, partition chromatography 160
Strychnos alkaloids, separation. 411
Sulphate ions, detection on paper chromatograms 90
Szilard-Chalmers reaction, separation of radioactive products found in the —— 501
Tannins, correlation between structure and paper chromatographic behaviour 537
Taurine, presence in retinas of various animals 266
Thiamine, chromatographic separation and determination of —— and thiamine phosphoric esters 545
Tobacco mosaic virus, paper electrophoresis 186
Tortuosity factor, in paper electrophoresis 446
Tyrosine, quantitative analysis of —— content of a radioactive protein by paper chromatography 524
Zone mobilities, calculation of —— of aliphatic ammonium ions in paper electrophoresis 449
——, calculation of —— of peptides from their diffusion coefficients 521

CHROMATOGRAPHIC DATA

SUPPLEMENT TO THE

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY

VOL. 1 (1958)

EDITOR:

M. LEDERER

(Arcueil, Seine)

ELSEVIER PUBLISHING COMPANY

AMSTERDAM LONDON NEW YORK PRINCETON

PRINTED IN THE NETHERLANDS BY
DRUKKERIJ MEIJER N.V. WORMERVEER AND AMSTERDAM

INTRODUCTION

Chromatography has often been compared to distillation when considering its importance in organic chemistry as a method of purification. There is, however, a fundamental difference between chromatography and electrophoresis on the one hand and other physical methods of analysis such as distillation or spectrography on the other, in that chromatographic methods depend on the chemical environment produced during the separation (adsorbent, solvent, etc.) while distillation, for example, has for a given compound only one physical constant, the boiling point, which varies solely with pressure.

The chromatographic data obtained by research workers are, for this reason, much more numerous, and it is becoming increasingly difficult to search the literature for the necessary information, especially since most abstracting journals give no or few data such as R_F values, retention volumes, or ionic mobilities, in their abstracts of publications.

We felt thus that a Journal of Chromatography should be set up, which would publish in Table form the most important data selected or collected from all scientific journals, instead of abstracting literature as do many journals, e.g. *Analytical Abstracts* or *Z. Anal. Chem.*, to mention only a few.

Some explanation is still required for pages ii and iii of this section. They are mathematical tables for the conversion of R_F to R_M values and an alignment chart for obtaining R_M directly from two R_F values. We begin with these two tables intentionally, since we firmly believe that the use of R_M values for structural problems and other theoretical aspects of chromatography will be very great in the future.

The sections on Chromatographic Data are placed in each issue in such a position that they can be taken out and collected after completion of a Volume.

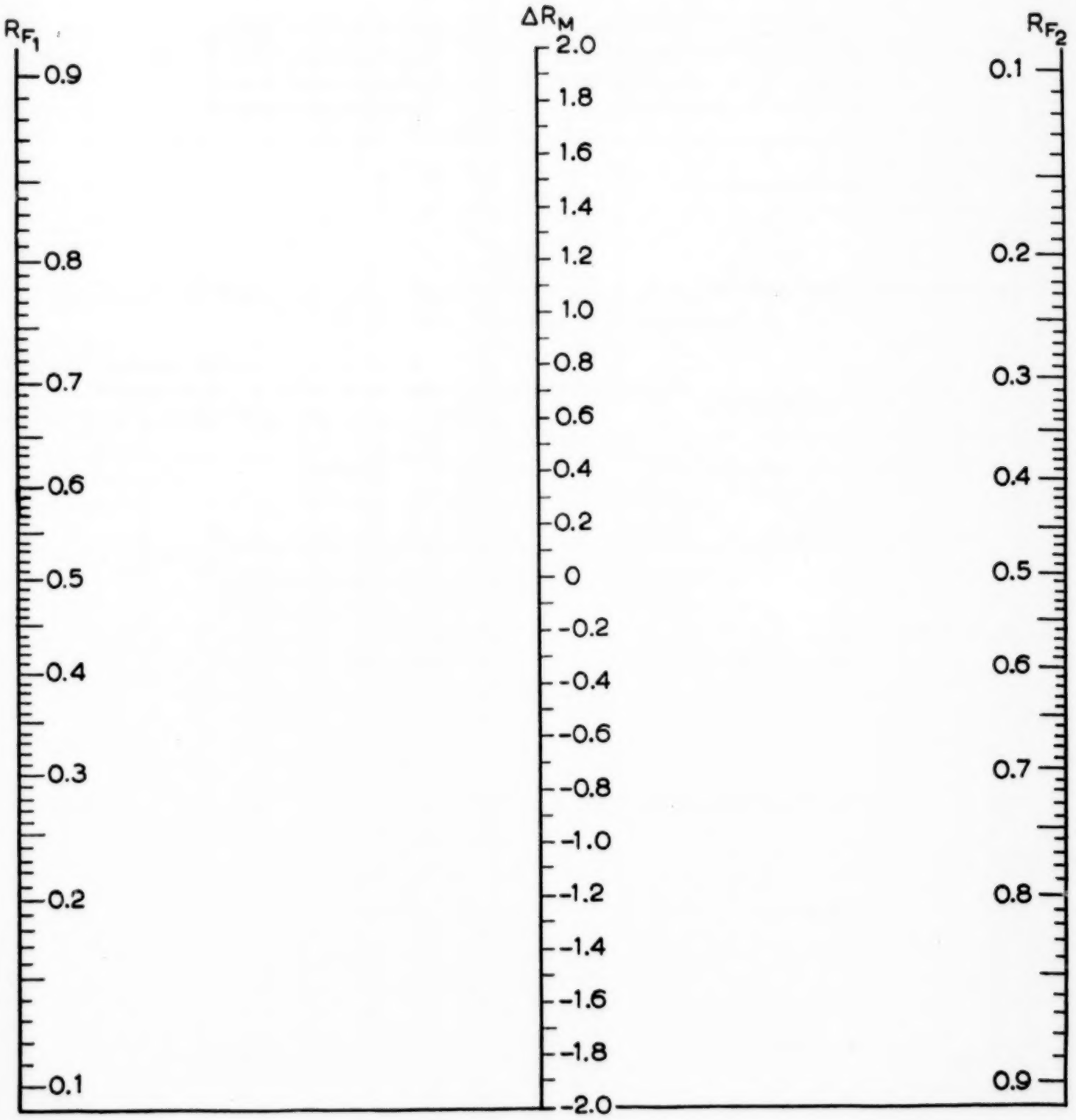
THE EDITOR

TABLE I

CONVERSION OF R_F TO R_M VALUES; $R_M = \log\left(\frac{1}{R_F} - 1\right)$

R_F	R_M	R_F	R_M	R_F	R_M	R_F	R_M
0.01	1.999	6	454	2	34	7	524
2	690	7	432	3	52	8	550
3	510	8	411	4	69	9	575
4	380	9	389	5	87	0.80	— 0.602
5	279	0.30	0.368	6	— 0.105	1	631
6	195	1	347	7	122	2	660
7	128	2	327	8	140	3	690
8	061	3	307	9	158	4	721
9	005	4	288	0.60	— 0.176	5	754
0.10	0.95	5	269	1	194	6	791
11	91	6	250	2	212	7	827
2	87	7	231	3	234	8	866
3	83	8	212	4	250	9	910
4	79	9	194	5	269	0.90	— 0.955
5	75	0.40	0.176	6	288	1	— 1.004
6	72	1	158	7	308	2	061
7	69	2	140	8	327	3	125
8	66	3	122	9	348	4	194
9	63	4	105	0.70	— 0.368	5	276
0.20	0.600	5	087	1	389	6	377
1	575	6	070	2	410	7	509
2	549	7	052	3	433	8	699
3	528	8	035	4	456	9	999
4	501	9	017	5	477		
5	477	0.50	0.000	6	500		
		1	— 0.017				

The editor is indebted to Dr. S. KERTES for compiling this table.



Alignment chart to calculate ΔR_M directly from R_{F_1} and R_{F_2}.

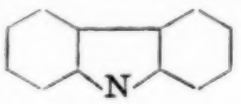
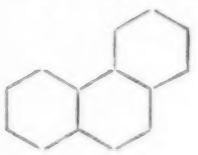
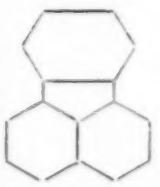
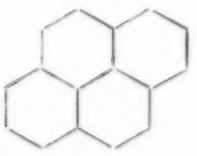
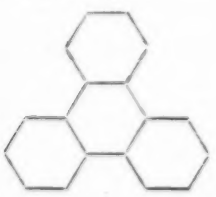
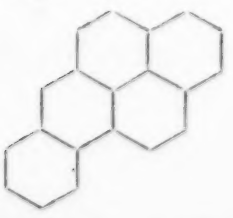
TABLE II

R_F VALUES OF AROMATIC HYDROCARBONS

(TH. WIELAND AND W. KRACHT, *Angew. Chem.*, 69 (1957) 172)

Paper: No. 2043b acetylated by its manufacturer Schleicher and Schuell, Dassel
Solvent: methanol 4, ether 4, water 1

$$R_B \text{ value} = \frac{\text{movement of 3,4-benzopyrene}}{\text{movement of substance}}$$

Substance	*Structure*	R_B *value*
Carbazole		5.35
Anthracene		4.5
Phenanthrene		4.12
Fluoranthene		4.0
Pyrene		3.78
Triphenylene		4.2
1,2-Benzanthracene		2.9
Chrysene		1.45
Perylene		3.3
3,4-Benzopyrene		1.0

See also D. S. TARBELL, E. G. BROOKER, A. VANTERPOOL, W. CONWAY, C. J. CLAUS AND T. J. HALL, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 767.

TABLE III

R_F VALUES OF GUANIDINE DERIVATIVES
(J. W. H. ZIJP, *Rec. trav. chim.*, 75 (1956) 1)

Solvent: acetone on paper buffered at pH 4 with a solution consisting of 61.45 ml 0.1 mol citric acid and 38.55 ml of 0.2 mol disodium phosphate
Reagent: 4% solution of sodium hypochlorite

Substance	*Colour of spot*	*R_F value*
*ortho*Tolylbiguanidine	yellow	0.35
Diphenylguanidine	red-brown	0.64
Di*ortho*tolylguanidine	red-brown	0.73
Triphenylguanidine	yellow-brown	0.85

TABLE IV

R_F VALUES OF SOME MERCAPTO COMPOUNDS (RUBBER ACCELERATORS AND ANTIOXIDANTS)
(J. W. H. ZIJP, *Rec. trav. chim.*, 75 (1956) 8)

Solvent: butanol saturated with water
Paper: Whatman No. 1 either untreated or buffered at pH 10
Reagent: 5% bismuth nitrate in 0.5 *N* HNO_3

Substance	*R_F values*	
	unbuffered paper	*buffered at pH 10*
2-Mercapto-imidazoline	0.56	0.54
2-Mercapto-thiazoline	0.76	0.78
2-Mercapto-benzimidazole	0.85	0.86
2-Mercapto-benzthiazole	0.91	0.54

TABLE V

R_F VALUES OF SOME HYDRAZINE DERIVATIVES
(R. L. HINMAN, *Anal. Chim. Acta*, 15 (1956) 125)

Reagents: ammoniacal silver nitrate or Ehrlich's reagent
Paper: Whatman No. 1

Compound	*Isoamyl alcohol* 10 *Acetic acid* 1.5 *Water* 10	*n-Butanol* 4 *Acetic acid* 1 *Water* 5	
	Cicular development	*Circular*	*Ascending*
1,2-Diformyl hydrazine	0.26		
1,2-Diacetyl hydrazine	0.48		
1,2-Dipropionyl hydrazine	0.81		
1,2-Dibutyryl hydrazine	0.91		
1,2-Diformyl-1,2-dimethyl hydrazine	0.60		
1,2-Diacetyl-1,2-dimethyl hydrazine	0.74		
1-Formyl-2,2-dimethyl hydrazine	0.72		
1-Acetyl-2,2-dimethyl hydrazine	0.76		
1-Benzoyl-2,2-dimethyl hydrazine	0.88		
Hydrazine dihydrochloride	0.00	0.39	0.16
1,1-Dimethylhydrazine hydrochloride	0.29	0.53	0.20
Trimethylhydrazine hydrochloride	—	0.42	0.23
1,2-Diethylhydrazine dihydrochloride	0.30	0.55	0.25
Ammonium chloride	—	0.33	
Methylamine hydrochloride	—	0.38	
Dimethylamine hydrochloride	—	0.41	

TABLE VI

R_F VALUES OF HYDRAZINE, HYDROXYLAMINE AND DERIVATIVES
(F. H. POLLARD AND A. J. BANISTER, *Anal. Chim. Acta*, 14 (1956) 70)

Solvent: water 15, HCl 4, diethyl ether 50 and methanol 50
Reagent: 0.5% picryl chloride in ethyl alcohol

$NH_2CO \cdot NH \cdot NH_2$	0.22
N_2H_4	0.23
NH_4Cl	0.36
NH_2OH	0.42
$C_6H_5 \cdot NH \cdot NH_2$	0.65
$C_6H_5 \cdot NH \cdot OH$	0.81, 0.95

TABLE VII

R_F VALUES OF DINITROTOLUENES, DINITRONAPHTHALENES AND DINITROANTHRAQUINONES

(J. FRANC, *Chem. Listy*, 49 (1955) 872)

Paper: Whatman No. 4 impregnated with paraffin (Bp 190–275°).
Solvent: 96% ethanol, water and acetic acid (20:14:1)

	R_F		R_F
o-Dinitrobenzene	0.76	1:5-Dinitroanthraquinone	0.00
m-Dinitrobenzene	0.56	1:8-Dinitroanthraquinone	0.77
1-Nitronaphthalene	0.33	1:6-Dinitroanthraquinone	0.43
1:5-Dinitronaphthalene	0.00	1:7-Dinitroanthraquinone	0.70
1:8-Dinitronaphthalene	0.80	Anthraquinone	0.28
1-Nitroanthraquinone	0.17		

TABLE VIII

R_F VALUES OF SUBSTITUTED HYDANTOINS

(J. P. VIGNE AND J. FONDARAI, *Bull. Soc. Chim.*, (1956) 124)

Paper: Whatman No. 1, allowed to reach equilibrium with a saturated atmosphere before development

	Butanol sat. with 1N HCl	*Butanol sat. with 4N NH_4OH*	*Pentane 100 Pyridine 1 sat. with benzyl alcohol and water*	*Hexane 100 Pyridine 1 sat. with benzyl alcohol and water*
5-Phenyl 5′-ethyl hydantoin	0.85	0.87	0.13	0.05
3-Methyl 5-phenyl 5′-ethyl hydantoin	0	1	0.75	0.80
5,5′-Diphenyl hydantoin		0.90	0	
3-Methyl 5,5′-diphenyl hydantoin		1	0	

TABLE IX

ELECTROMIGRATION OF FOOD COLOURS

(I. MORI AND M. KIMURA, *J. Pharm. Soc.*, 74 (1954) 179)

Paper: Toyo filter paper No. 50

Conditions:

	Electrolyte	*volts*	*mA/cm*	*hours*
I	30% acetic acid	700	0.5	4
II	10% acetic acid	700	0.6	1
III	1% borax	500	1.0	4
IV	0.1% NH_4OH	700	0.4	1
V	5% $NaH\,CO_3$	200	2.5	4

	I	*II*	*III*	*IV*	*V*
Acid green	13* (62**)		12* (76*)		
Amaranth	38	30 (71)	23*, 60**	80	21
Auramine conc.	— 49	— 30	— 24	— 18	5
Bismarck brown	— 60	— 10	— 3	0	
Diamond green	— 36 (— 59)	— 16 (— 38)	— 6	— 3***	
Eosine	4	0	21	22 (38)	
Fluoresceine	12	— 8	46	74	
Guinea green	26	16	25	24	13
Indigo carmine	54	49	48, 75***	60	14
Haematoxylene	5		0		
Light green	49	41	70	74	
Light green SF yellow	33		55		
Malachite green	— 42	— 27	— 10	0	
Naphthol green	23	21	28	28	
New coccine	73	82	90	81	54
Patent blue	27		20		
Patent blue A.O.O.	29		33		
Phloxine	0		33		
Rhodamine 6G	— 35	— 21	— 13	8	
Solar pure blue XX	— 15	— 10	20	18	
Tartrazine	72	80	85		43
Toluidine blue	— 36		— 3		
Wool blue SB Conc	65	57	50	4 (53***)	
G acid****	78				21
H acid****	51				19
R acid****	93				23

* Blue spot. ** Yellow spot. *** Small spot. **** 2 hours. ( ) Fluorescence.

TABLE X

R_F VALUES OF NAPHTHOLSULPHONIC ACIDS
(J. LATINAK, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 20 (1955) 1371)

Name	*Position of*		*n-Butanol 4 Acetic acid 1 Water 5*	*n-Butanol 3 Pyridine 1 Water 1*
	—OH	*—SO_3H*		
1-Naphthol-3,6,8-trisulphonic acid	1	3,6,8	0.02	0.02
ε-acid	1	3,8	0.10	0.14
δ-acid	1	4,8	0.09	0.21
1-Naphthol-2-sulphonic acid	1	2	0.79	0.80
1-Naphthol-3-sulphonic acid	1	3	0.61	0.69
Nevile-Winther acid	1	4	0.52	0.67
Naphthol-L-acid	1	5	0.50	0.67
Schöllkopf acid	1	8	0.72	0.77
1-Naphthol	1	—	0.95	0.93
2-Naphthol-3,6,8-trisulphonic acid	2	3,6,8	0.02	0.02
R-acid	2	3,6	0.04	0.11
G-acid	2	6,8	0.05	0.12
Oxy-Tobias acid	2	1	0.71	0.80
Schäffer acid	2	6	0.47	0.66
F-acid	2	7	0.48	0.66
Crocein acid	2	8	0.54	0.70
2-Naphthol	2	—	0.94	0.93

TABLE XI

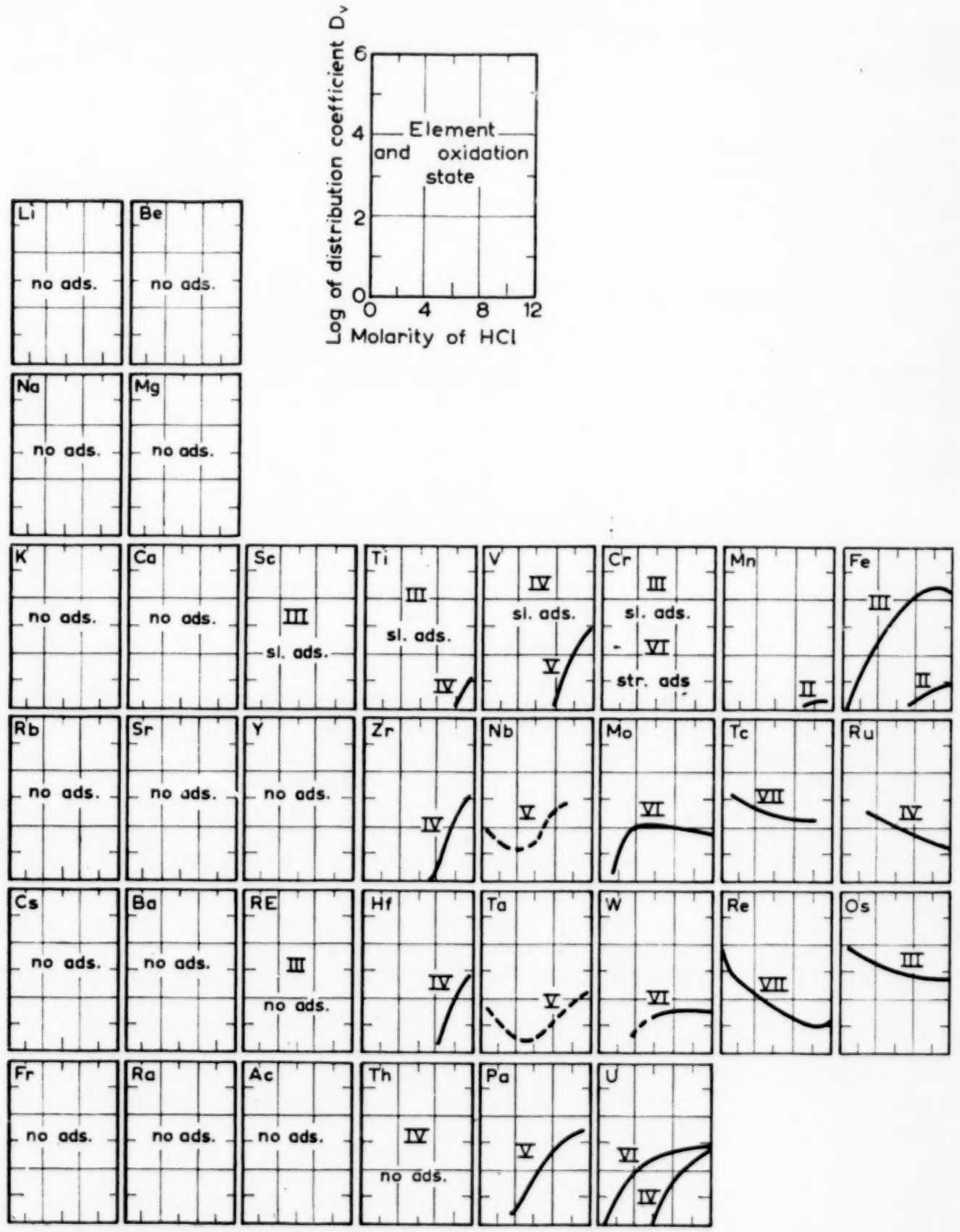
R_F VALUES OF ALKALI METALS IN MIXTURES OF PHENOL, METHANOL AND CONC. HCl
(R. J. MAGEE AND J. B. HEADRIDGE, *Analyst*, 82 (1957) 95)

Solvent			*R_F values of*					
phenol g	*methanol ml*	*conc. HCl ml*	Li^+	Na^+	K^+	Rb^+	Cs^+	NH_4^+
33	33	33	0.55	0.24	0.21	0.28	0.42	0.42
42	16	42	0.42	0.27	0.31	0.43	0.55	0.31
20	30	50	0.70	0.44	0.43	0.50	0.64	0.64
50	30	20	0.37	0.14	0.10	0.16	0.30	0.30
25	50	25	0.57	0.19	0.11	0.14	0.23	—
40	50	10	0.51	0.11	0.05	0.08	0.15	—
50	40	10	0.37	0.06	0.04	0.06	0.13	—
40	40	20	0.45	0.12	0.08	0.12	0.21	—
60	20	20	0.27	0.11	0.12	0.19	0.38	0.24

TABLE XII

ION EXCHANGE DATA FOR DOWEX-1 WITH HCl

(K. A. KRAUS AND F. NELSON, *Peaceful Uses of Atomic Energy Conference, Geneva*, 1955, Vol. VII)



no ads. = no adsorption in 0.1–12 *N* HCl
sl. ads. = slight adsorption in 12 *N* HCl
str. ads. = strong adsorption, $D_v \gg 1$.

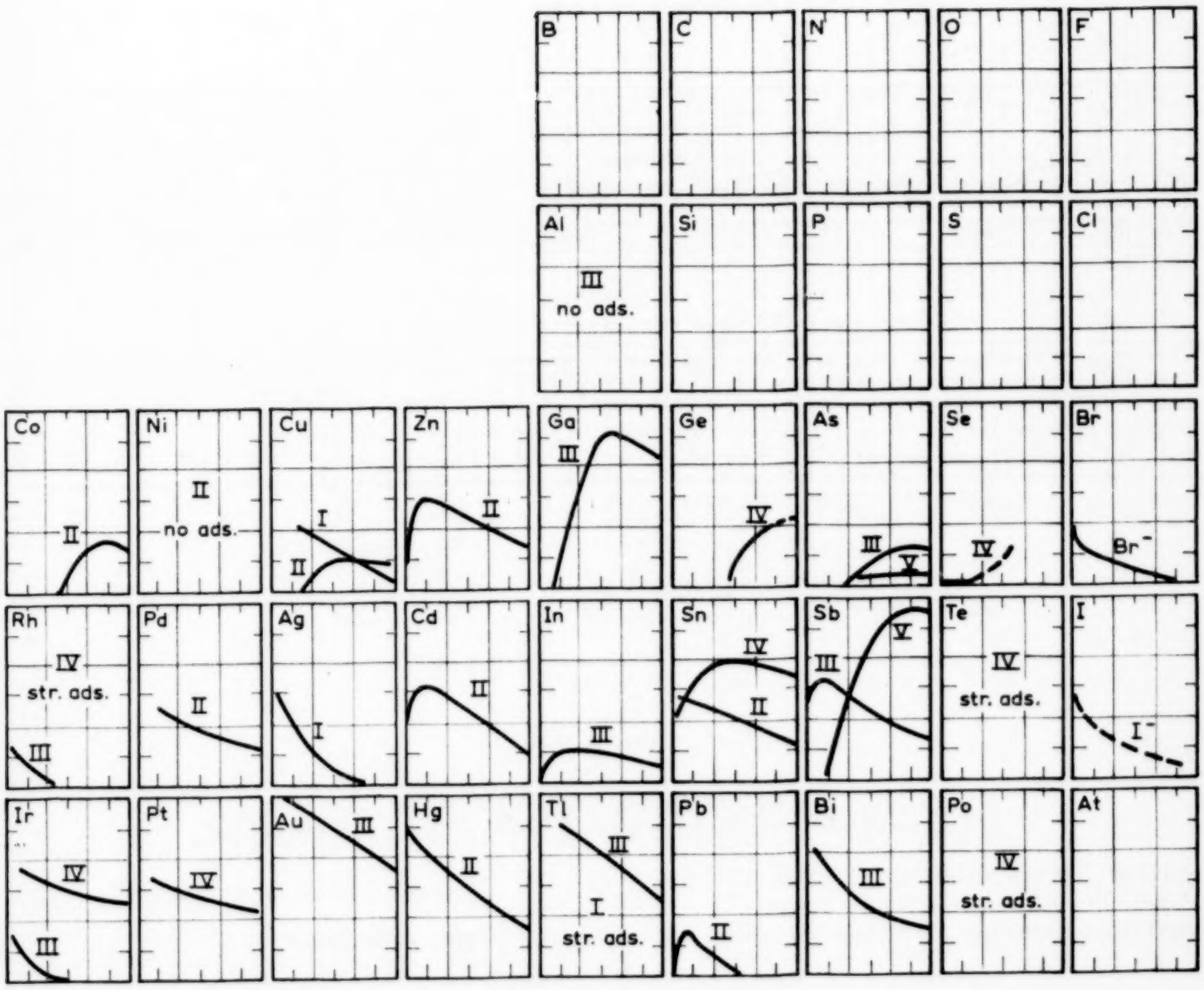

B
C
N
O
F
Al
III
no ads.
Si
P
S
Cl
Co
II
Ni
II
no ads.
Cu
I
II
Zn
II
Ga
III
Ge
IV
As
III
V
Se
IV
Br
Br⁻
Rh
IV
str. ads.
III
Pd
II
Ag
I
Cd
II
In
III
Sn
IV
II
Sb
III
V
Te
IV
str. ads.
I
I⁻
Ir
IV
III
Pt
IV
Au
III
Hg
II
Tl
III
I
str. ads.
Pb
II
Bi
III
Po
IV
str. ads.
At

TABLE XIII

R_F VALUES OF IONS IN BUTANOL–HCl MIXTURES

(R. A. GUEDES DE CARVALHO, *Anal. Chim. Acta*, 16 (1957) 555)

All solvents were prepared by shaking equal volumes of aqueous acid and butanol. After 2*N* HCl only one phase is formed.

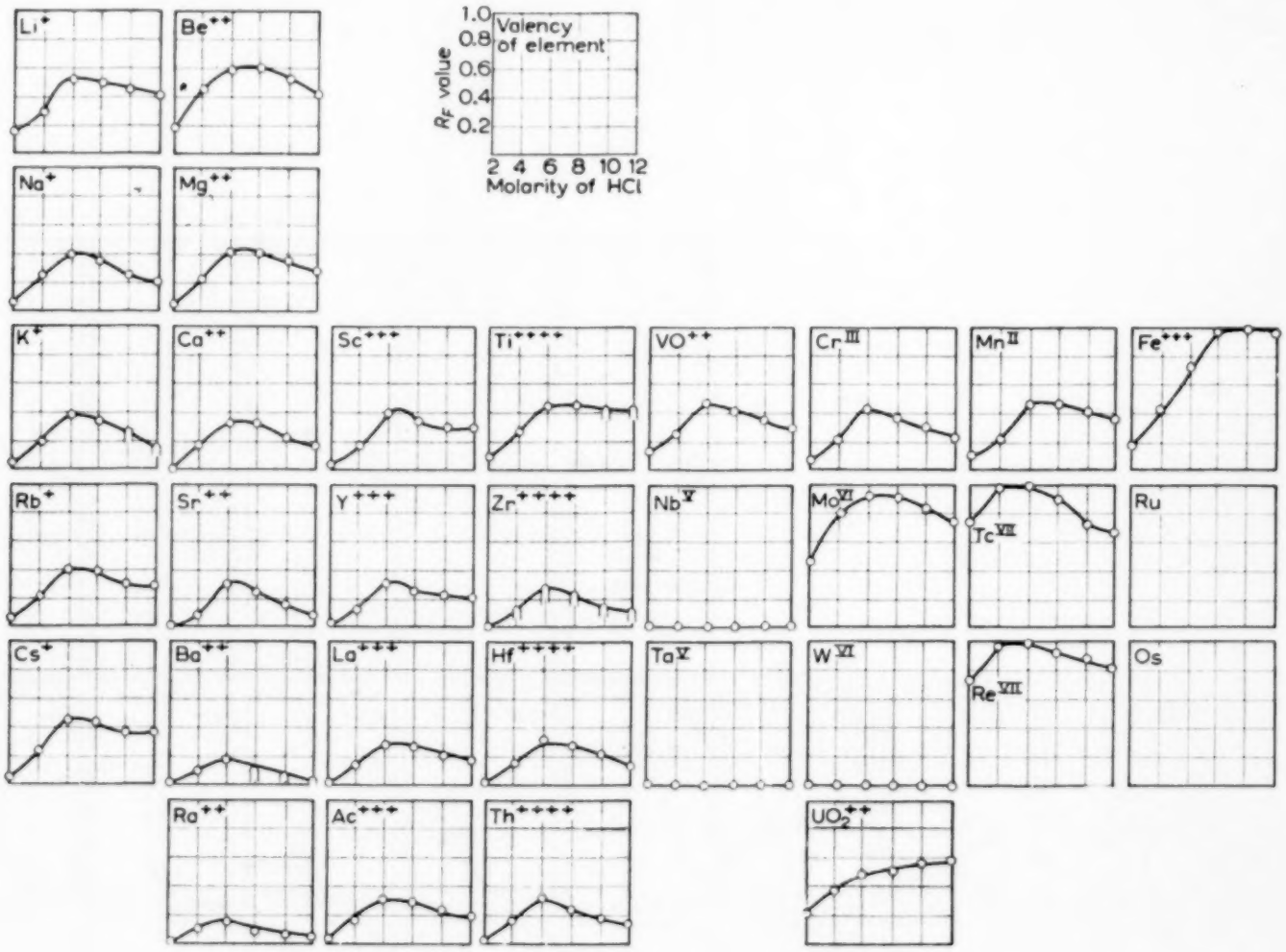


TABLE XIV

R_F VALUES OF INORGANIC IONS

(H. HARTKAMP AND H. SPECKER, *Z. anal. Chem.*, 158 (1957) 92)

Solvent: Tetrahydrofuran 50; conc. HCl 15.
Paper: Schleicher und Schüll 2043b.
Method: ascending. R_F values measured with reference to the water front.

Ion	R_F	*Ion*	R_F
Ba^{++}	0.00	Cu^{++}	0.90
Sr^{++}	0.099	UO_2^{++}	0.98
Ca^{++}	0.20	Zn^{++}	1.00
Ni^{++}	0.28	Cd^{++}	1.00
Mg^{++}	0.34	Hg^{++}	1.00
Al^{+++}	0.35	Ga^{+++}	1.00
Cr^{+++}	0.44	In^{+++}	1.00
Ti^{IV}	0.44	Sn^{++}	1.00
Mn^{++}	0.50	As^{+++}	1.00
VO_3^-	0.55	Sb^{+++}	1.00
Be^{++}	0.61	Bi^{+++}	1.00
SeO_3^{--}	0.76	MoO_4^{--}	1.00
Co^{++}	0.78	Fe^{+++}	1.00

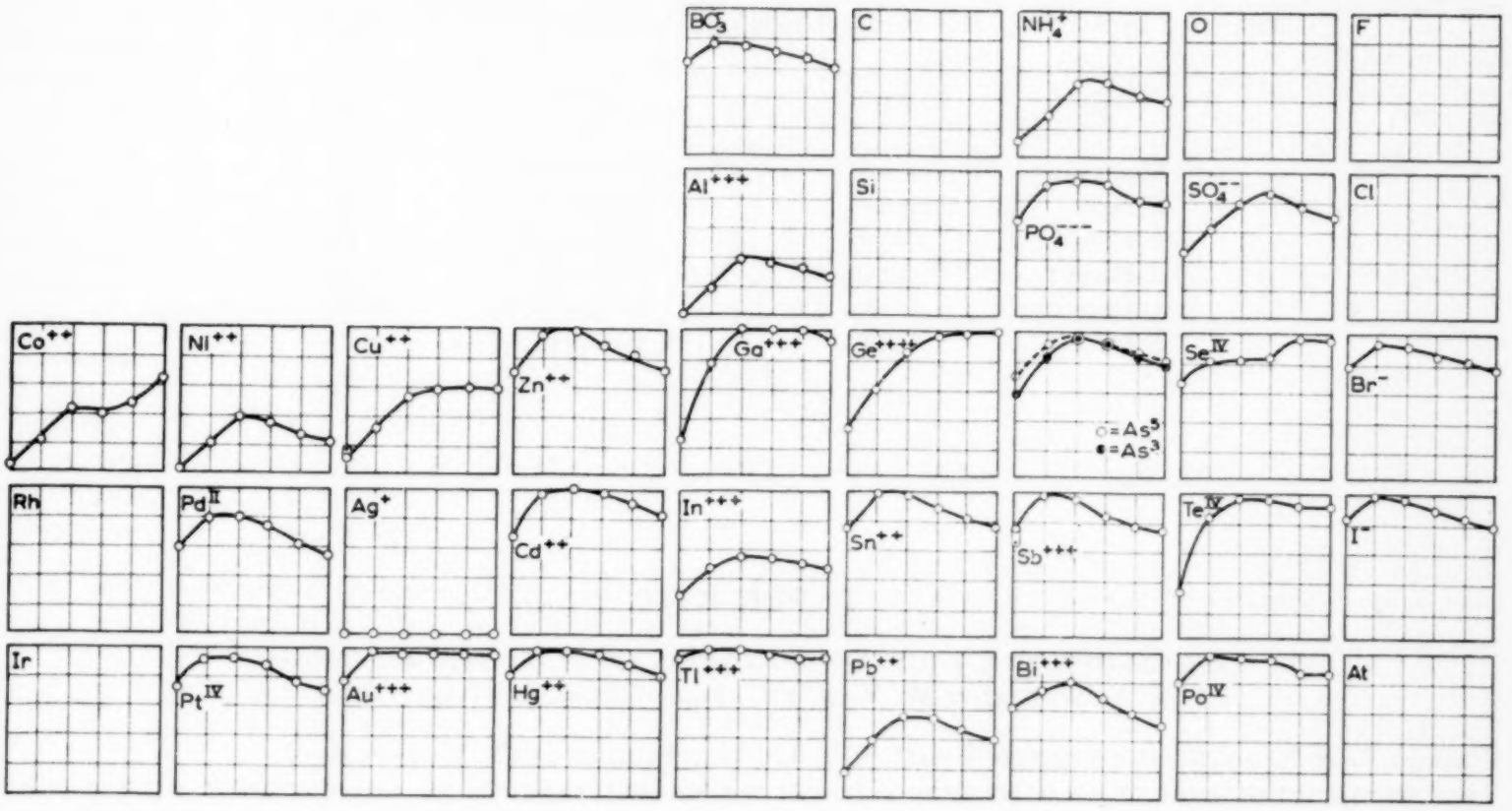


TABLE XV

R_F VALUES OF SOME FISSION PRODUCT ELEMENTS AND GROUPS

(H. GÖTTE AND D. PÄTZE, *Angew. Chem.*, 69 (1957) 608)

Paper: Schleicher und Schüll 2040a.

Ion	R_F *in* 30% *ethanol* 30% *methanol* 40% 2*N HCl*	R_F *in* 40% *ethanol* 40% *methanol* 20% 2*N HCl*	R_F *in* 30% *ethanol* 30% *butanol* 40% 5*N HCl*
UO_2^{++}	0.73	0.72	
Co^{++}		0.61	
TeO_3^{--}	0.57		
Sb^{+++}	0.80		
Sn^{+++}	0.93		
Ag^{+}		0	0
Rh(III)			
two spots		0.54	0.43 and 0.59
Cu^{++}		0.54	0.51
Mo(VI)			0.72
Pd(II)		0.84	0.84
Cd^{++}		0.96	0.91

TABLE XVI

R_B VALUES OF 3,5-DINITROBENZOATES OF ALIPHATIC ALCOHOLS
(F. MICHEEL AND W. SCHMINKE, *Angew. Chem.*, 69 (1957) 334)

Paper: Acetylcellulose paper containing 14% acetyl.
Solvent: Ethyl acetate : dioxan : water 20:45:46.

$$R_B \text{ value} = \frac{\text{distance moved by spot}}{\text{distance moved by the methyl ester of 3,5-dinitrobenzoic acid}}$$

Ester	R_B	*Ester*	R_B
Methyl	1.00	*n*-Heptyl	0.41
Ethyl	0.85	*n*-Octyl	0.31
n-Propyl	0.73	*n*-Nonyl	0.25
n-Butyl	0.60	*n*-Decyl	0.21
n-Pentyl	0.55	*n*-Undecyl	0.17
n-Hexyl	0.48	*n*-Dodecyl	0.13

TABLE XVII

R_F VALUES OF 3,5-DINITROBENZOATES OF ALIPHATIC ALCOHOLS
(E. SUNDT AND M. WINTER, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 851)

Paper: S. & S. 2043b impregnated with dimethylformamide (50% in acetone).
Development: saturation in atmosphere for 12 hours then descending development with decalin saturated with dimethylformamide.

Alcohol	R_F *value*	*Alcohol*	R_F *value*
Methanol	0.21	1-Hexen-3-ol	0.69
Ethanol	0.40	1-Pentanol	0.72
1-Propanol	0.50	1-Hexen-2-ol	0.73
2-Propanol	0.52	1-Hexanol	0.79
Sorbic alcohol	0.55	1-Nonenol	0.86
1-Butanol	0.64	Lauric alcohol	0.92

TABLE XVIII

R_F VALUES OF THE "CHRYSENE FRACTION" OF AN AROMATIC TAR ON ACETYLATED PAPER
(E. D. BERGMANN AND T. GRUENWALD, *J. Appl. Chem.*, 7 (1957) 15)

	Toluene 1 Methanol 6 Water 1	*Toluene 1 Methanol 10 Water 1*	*Light petroleum 1 Methanol 8 Water 2*
Chrysene	0	0	0
3:4-Benzpyrene	0.02	0.06	0.05
1:2-Benzanthracene	0.10	0.16	0.15
2:3-Benzfluorene	0.14	0.23	0.17
Fluoranthene	0.15	0.24	0.19
3:4-Benzfluorene	0.14	0.23	0.18
Pyrene	0.19	0.27	0.22

TABLE XIX

R_F VALUES OF ANTHRACENES ON ACETYLATED PAPER
(E. D. BERGMANN AND T. GRUENWALD, *J. Appl. Chem.*, 7 (1957) 15)

Solvent		*Anthracene*	*1-Methyl-anthracene*	*2-Methyl-anthracene*	*2,7-Dimethyl-anthracene*	*1,4-Dimethyl-anthracene*
Ethyl acetate Pyridine Water	3 5 10	0.62	0.59	0.55	0.39	0.61
Butyl acetate Pyridine Water	1 5 10	0.76	0.82	0.71	0.42	0.82
Toluene Methanol Water	1 10 2	0.70	0.31	0.26	0.05	0.33
Light petroleum Methanol Water	2 10 2	0.19	0.34	0.27	0.05	0.36
Benzene Ethyl acetate Methanol Water	1 9 9 5	0.57	0.65	0.59	0.36	0.68

TABLE XX

R_F VALUES OF FLUORENES
(E. D. BERGMANN AND T. GRUENWALD, *J. Appl. Chem.*, 7 (1957) 15)

Solvent		*Fluorene*	*1-Methylfluorene*	*2-Methylfluorene*	*3-Methylfluorene*
On propylene glycol impregnated paper					
Toluene Methanol	1 1	0.42	0.43	0.31	0.33
Methanol		0.74	0.71	0.70	0.70
Methanol Water	85 20	0.78	0.73	0.71	0.71
Methanol Water Acetic acid	85 10 5	0.84	0.76	0.73	0.72
On acetylated paper					
Butyl acetate Pyridine Water	1 4 10	0.58	0.56	0.62	0.64
Light petroleum Methanol Water	2 9 2	0.30	0.35	0.39	0.30
Toluene Methanol Water	1 8 2	0.33	0.39	0.30	0.31
Benzene Ethyl acetate Methanol Water	2 9 5 5	0.59	0.62	0.60	0.58

TABLE XXI

ELECTROMIGRATION OF INORGANIC ACIDS

(M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 17 (1957) 606 and D. GROSS, *Chem. & Ind.*, (1957) 1597)

	mm moved in 2% $(NH_4)_2CO_3$ in 1 hour with 150 volt in Jouan apparatus (Lederer)	*Relative rate to Cl^- in 0.1 M $(NH_4)_2CO_3$ with 100 volt cm (high voltage technique) (Gross)*
Borate	33	
Arsenite	36.5	
Arsenate	61	
Phosphate	59	0.56
Pyrosphosphate	57	
Grahams salt	56	
Nitrite	83	0.95
Nitrate	83	0.91
Chloride	80	1.00*
Chlorate	76	0.84
Bromide	83	1.03
Bromate	67	0.73
Iodide	82	0.96
Iodate	50	0.49
Periodate	0 and 11 (2 spots)	
Fluoride	67	0.71
Thiocyanate	64	0.81
Sulphite	70	0.71
Thiosulphate	86	0.92
Sulphate	78	0.84
Persulphate	80	0.92
Selenite	60	
Tellurite	49	
Tellurate	38 with comet	
Pertechnetate	59	
Perrhenate	59	
Ferrocyanide	85	0.87
Ferricyanide	72	0.96
Metavanadate	60	
Molybdate	63	
Perchlorate		0.85
Sulphide		0.92
Metabisulphite		0.71

* Standard for comparison.

TABLE XXII

R_F VALUES OF HYDROXYSTEARIC ACIDS

(K. WINSAUER, *Mikrochim. Acta*, (1957) 481)

Solvent: Butanol 75, ethanol 15, water 8, conc. NH_4OH 2.

Substance	*R_F value*
Dihydroxystearic acid	0.65
Tetrahydroxystearic acid	0.52
Hexahydroxystearic acid	0.24

TABLE XXIII

ELECTROMIGRATION OF ALDEHYDES AND KETONES

(O. THEANDER, *Acta Chem. Scand.*, 11 (1957) 717)

$$M_v = \frac{\text{true distance of migration of the substance}}{\text{true distance of migration of vanillin}}$$

Paper: Whatman No. 3.
Technique: A. B. FOSTER, *Chem. & Ind.*, (1952) 1050.
Sulphite buffer: 0.1 *M* hydrogen sulphite buffer at pH 4.7 was prepared by dissolving 9.5 g dry sodium pyrosulphite, 8.8 g sodium acetate trihydrate and sufficient acetic acid (for pH 4.7 this is about 2.3 ml) in 1 litre of water. Room temperature, 13–18.5 V/cm for 3–5 h.

Compound	M_v
Aldehydo-pentacetylglucose	0.86
Methyl *α*-D-3-ketoglucopyranoside	0.50
Methyl *β*-D-2-ketoglucopyranoside	0.88
Methyl *β*-D-3-ketoglucopyranoside	0.85
Methyl *β*-D-6-aldehydoglucopyranoside	0.92
Glucuronic acid	0.95
Galacturonic acid	1.43
2-Ketogluconic acid	1.13
5-Ketogluconic acid	1.02
Periodate oxidized methyl-*β*-glucopyranoside	1.02 1.48
Periodate oxidized methyl-*β*-xylopyranoside	1.62
n-Heptanal	0.98
Diacetyl	0.69
Citral	1.36
Cinnamic aldehyde	1.18
Cyclohexanone	1.14
Cyclohexane-1:3-dione	1.78
Furfural	1.29
ω-Hydroxymethylfurfural	1.07
Benzaldehyde	1.16
o-Hydroxybenzaldehyde (Salicylaldehyde)	0.95
m-Hydroxybenzaldehyde	1.16
3,4-Dimethoxybenzaldehyde (Veratraldehyde)	1.03
3,4,5-Trimethoxybenzaldehyde	1.01
4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (Vanillin)	1.00
2-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (Orthovanillin)	1.10
4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde (Syringaldehyde)	0.95
2,4-Dihydroxybenzaldehyde	0.82
3,4-Dihydroxybenzaldehyde (Protocatechualdehyde)	1.00
2,6-Dihydroxy-4-methylbenzaldehyde (Atranol)	0.74
3-Aldehydo-4-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (Formylvanillin)	1.53

TABLE XXIV

R_F VALUES OF THE 2,4-DINITROPHENYLHYDRAZONES OF ALDEHYDES AND KETONES
(J. GASPARIC AND M. VECERA, *Coll. Czech. Chem. Communs.*, 22 (1957) 1426)

Paper: Whatman No. 4 dipped into a 25% solution of dimethylformamide in ethanol and allowed to dry 10 to 15 minutes.
Solvent: Cyclohexane.
Reagent: 1% NaOH in ethanol.

Compound	R_F	*Compound*	R_F
Formaldehyde	0.20	Acetone	0.48
Acetaldehyde	0.32	Methyl ethyl ketone	0.66
Acrolein	0.39	Hexen-1-one-5	0.71
Crotonaldehyde	0.47	Diethyl ketone	0.81
Propionaldehyde	0.50	Methyl *n*-butyl ketone	0.85
n-Butyraldehyde	0.66	Methyl isobutyl ketone	0.85
n-Valeraldehyde	0.76	Cyclopentanone	0.64
Isovaleraldehyde	0.76	Cyclohexanone	0.77
n-Hexylaldehyde	0.82	2-Methylcyclohexanone	0.85
2-Ethylhexylaldehyde	0.88	3-Methylcyclohexanone	0.85
Dodecylaldehyde	0.91	4-Methylcyclohexanone	0.85
Fural (*trans*-form)	0.12	Dihydroxyacetone	0
Fural (*cis*-form)	0.26	Diacetyl (monohydrazone)	0.22
		Diacetyl (dihydrazone)	0
		2,4-Dinitrophenylhydrazine	0.01

TABLE XXV

R_F VALUES OF SOME PHENOLS
(J. GASPARIC AND M. VECERA, *Mikrochim. Acta*, (1958) 68)

Solvent systems: I. Formamide–Cyclohexane, II. Formamide–Cyclohexane–Pyridine (25:1), III. Cyclohexane–Chloroform–Ethanol (27:3:0.6), IV. Benzene–Cyclohexane (1:12).

	I	*II*	*III*	*IV*
Phenol	0.12	0.32	0.23	—
o-Cresol	0.30	0.58	0.59	0.49
m-Cresol	0.19	0.46	0.41	0.27
p-Cresol	0.19	0.44	0.38	0.30
o-Ethylphenol	0.55	0.76		
m-Ethylphenol	0.37	0.63		
p-Ethylphenol	0.35	0.61		
2,3-Dimethylphenol	0.40	0.68		
2,4-Dimethylphenol	0.40	0.68		
2,5-Dimethylphenol	0.42	0.69		
3,4-Dimethylphenol	0.25	0.41		
3,5-Dimethylphenol	0.30	0.46		

TABLE XXVI

R_F VALUES OF PYRIDINE HOMOLOGUES

(WATARU FUNASAKA AND TSUGUO KOJIMA, *J. Chem. Soc. Japan, Ind. Chem. Sect.*, 60 (1957) 427)
Solvent: butanol saturated with 2 *N* HCl

Substance	*R_F values*
Pyridine	0.30
α-Picoline	0.50
β-Picoline	0.50
2,3-Lutidine	0.66
2,4-Lutidine	0.65
2,6-Lutidine	0.71
3,5-Lutidine	0.75
2,4,6-Collidine	0.85

(Compare W. R. WALKER, *Australian J. Sci.*, 13 (1950) 26, 84.)

TABLE XXVII

R_F VALUES OF SURFACE ACTIVE QUATERNARY AMMONIUM AND PYRIDINIUM CHLORIDES

(H. HOLNESS AND W. R. STONE, *Analyst*, 83 (1958) 71)

Paper: Whatman No. 1
Solvent: 35 or 40 ml industrial methylated spirits + 5 ml HCl made up to 100 ml with water
Temperature: 30°
Time of run: 7 hours approx.
Technique: Ascending

Substance	*R_F values*	
	35% alcohol	*40% alcohol*
n-Alkyltrimethylammonium salts:		
Lauryl	0.86	0.92
Myristyl	0.65	0.79
Cetyl	0.36	0.55
Stearyl	0.10	0.23
n-Alkylbenzyldimethylammonium salts:		
Lauryl	0.71	0.85
Myristyl	0.39	0.61
Cetyl	0.20	0.40
Stearyl	0.06	0.14
n-Alkylpyridinium salts:		
Lauryl	0.81	0.90
Myristyl	0.58	0.75
Cetyl	0.31	0.54
Stearyl	0.08	0.20

TABLE XXVIII

R_F VALUES OF ORGANIC PEROXIDES

(M. H. ABRAHAM, A. G. DAVIES, D. R. LLEWELLYN AND E. M. THAIN, *Anal. Chim. Acta*, 17 (1957) 499)

Conditions: Whatman No. 4 paper impregnated with a 5% solution of Silicone Fluid M.S.1107 in cyclohexane and heated at 110° for 1 hour
Solvent: Water–ethanol–chloroform (6:10:10)
Paper equilibrated with aqueous phase of solvent for 1 hour before run

Substance	R_F *value*
Hydrogen peroxide	0.84
Pinane hydroperoxide	0.61
1-Phenylethyl hydroperoxide	0.86
1-Phenylpropyl hydroperoxide	0.80
2-Phenyl-2-propyl hydroperoxide	0.85
2-Phenyl-2-butyl hydroperoxide	0.75
1,2,3,4-Tetrahydro-1-naphthyl hydroperoxide	0.78
Decahydro-9-naphthyl hydroperoxide	0.50
Triphenylmethyl hydroperoxide	0.19
Tri(*p*-nitrophenyl)methyl hydroperoxide	0.14
tert.-Butyl perbenzoate	0.17
tert.-Butyl diperterephthalate	0.16 (comet to 0)
Benzoyl peroxide	0.00
Diphenylmethyl 9-xanthenyl peroxide	0.16

TABLE XXIX

R_F VALUES OF OXIDATION PRODUCTS OF THYRONINE

(S. LISSITZKY AND M. ROQUES, *Bull. soc. chim. biol.*, 39 (1957) 521)

Solvent: Butanol–acetic acid–water (78:5:17)

Substance	R_F	*Substance*	R_F
Phenylalanine	0.35	Monoiodo-hydroquinone	0.88
o-Tyrosine	0.26	Monoiodotyrosine	0.40
m-Tyrosine	0.20	Diiodotyrosine	0.55
p-Tyrosine	0.18	5-Hydroxy-3-monoiodotyrosine	0.25
2,3-DOPA	0.12	3-Monoiodothyronine	0.64
2,5-DOPA	0.10	3′-Hydroxy-3-monoiodothyronine	0.53
3,4-DOPA	0.08	3′-Monoiodothyronine	0.68
Hydroquinone	0.80	3,3′-Diiodothyronine	0.70
Catechol	0.84	3,5-Diiodothyronine	0.73
Hydroxyhydroquinone	0.65	3′,5′-Diiodothyronine	0.80
Thyronine	0.68	3′-Hydroxy-3,5-diiodothyronine	0.55
3′-Hydroxythyronine	0.51	Iodide	0.19
Diiodo-hydroquinone	0.94		

TABLE XXX

PAPER ELECTROPHORESIS OF AROMATIC AMINES
(C. HANOT, *Bull. soc. chim. Belges*, 66 (1957) 76)

Conditions: HCl–KCl buffer of pH = 2.7 and ionic strength = 0.004. 105 or 220 V for 2 hours

Amine	*Relative mobilities*
α-Naphthylamine	1
Aniline	1.33
Methylaniline	1.66
Dimethylaniline	1.23
p-Aminobenzoic acid	0.86
o-Chloroaniline	1.06
m-Chloroaniline	1.06
p-Chloroaniline	1.06
m-Xylidine	1.06
m-Toluidine	1.32
o-Toluidine	1.44
β-Naphthylamine	1.00
Dimethyl-*α*-naphthylamine	1.01

TABLE XXXI

R_F VALUES OF AROMATIC HYDRAZO COMPOUNDS
(M. VEČEŘA, J. PETRÁNEK AND J. GASPARIČ, *Collection Czechoslov. Chem. Communs.*, 23 (1958) 333)

	Dimethylformamide–cyclohexane	*Formamide–cyclohexane*	*Formamide–benzene*
Hydrazobenzene	0.23	0.85	0.97
4-Methylhydrazobenzene	0.36	0.89	0.98
2-Methylhydrazobenzene	0.46	0.91	0.98
4,4′-Hydrazotoluene	0.51	0.91	0.98
2,2′-Hydrazotoluene	0.70	0.93	0.99
1,1′-Hydrazonaphthalene	0.31	0.85	0.97
p-Acetylaminohydrazobenzene	0	0	0.38
p-Benzoylaminohydrazobenzene	0	0	0.84
N-Acetylhydrazobenzene	0	0.33	0.93

TABLE XXXII

R_F VALUES OF OESTROGENS
(H. STRUCK, *Naturwiss.*, 45 (1958) 41)

Paper: Schleicher und Schuell 2043b (acetylated)
Solvent: methanol–water (80:20)

Substance	R_F *value*
Oestrone	0.39
Oestradiol	0.54
Oestriol	0.65
Equilin	0.38
Equilenin	0.31

TABLE XXXIII

R_F VALUES OF POLYCYCLIC HYDROCARBONS

(E. MALÝ, *Nature*, 181 (1958) 698)

Paper: Whatman No. 4 impregnated with a 10% petroleum ether solution of paraffin oil and drying for 15 min
Solvent: Methanol saturated with paraffin oil

Substance	*R_F value*
Anthracene	0.43
Phenanthrene	0.41
Pyrene	0.36
Chrysene	0.31, 0.34
3:4-Benzpyrene	0.28
1:2,5:6-Dibenzanthracene	0.25

TABLE XXXIV

R_G VALUES OF SUGARS. NEW SOLVENT FOR THE SEPARATION OF GLUCOSE AND SORBITOL

(W. R. REES AND T. REYNOLDS, *Nature*, 181 (1958) 767)

Solvent: Methyl ethyl ketone–acetic acid–satd. aqueous boric acid (9:1:1)
Paper: Whatman No. 54

Sugar	*R_G value*
Sorbitol	3.0
Mannitol	2.5
D-Fructose	1.9
D-Arabinose	2.0
D-Xylose	2.9
D-Ribose	7.0
Maltose	0.2

TABLE XXXV

R_F VALUES OF FOOD COLOURS

(I. NETTO, *Ann. fals. et fraudes*, 50, No. 580 (1957))

Paper: Whatman No. 1
Solvent: 1 *N* HCl

Colour	*Colour Index No.*	*R_F values*
Ponceau 3R	80	0.031–0.040
Amaranth	184	0.063–0.077
Indigotine	1180	0.131–0.099
Tartrazine	640	0.320–0.340
Naphthol Yellow S	10	0.534–0.574
Guinea Green B	666	0.791–0.860

TABLE XXXVI

R_G VALUES OF ORGANIC ACIDS

(J. CARLES, A. SCHNEIDER AND A. M. LACOSTE, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 221)

Paper: Arches No. 302
Solvent I: 95 ml ethanol 96% + 5 ml conc. NH_4OH
Solvent II: Butanol–formic acid–water (4:1:5), 12 h old

$$R_G \text{ value} = \frac{\text{Distance moved by acid}}{\text{Distance moved by glycolic acid}} \times 100$$

Acid	*R_G in solvent*		*Acid*	*R_G in solvent*	
	I	*II*		*I*	*II*
Aconitic	20	135	*m*-Aminobenzoic	115	120
Adipic	80	145	*p*-Aminobenzoic	105	140
Aspartic	20	25	*p*-Hydroxybenzoic	140	153
Ketoglutaric	60	110	Caffeic	90	135
Citraconic	55	128	Chlorogenic	80	105
Citramalic	50	110	Cinnamic	200	160
Citric	15	75	*o*-Coumaric	160	155
Isocitric	10	75	Kynurenic	160	125
Fumaric	60	145	Furoic	180	150
Galacturonic	35	15	Gallic	70	95
Glutamic	40	35	Gentisic	180	153
Glutaric	50	130	Hippuric	190	150
	60	140	Indoleacetic	160	150
Glyceric	90	70	Mandelic	190	145
Glycolic	100	100	Nicotinic	175	110
Itaconic	55	140	Phenylacetic	200	155
Lactic	145	120	*p*-Aminophenyl-acetic	130	95
Maleic	45	105	Phenylpropionic	210	160
Dihydroxymaleic	190	130	Phthalic	60	145
	220	120	Protocatechuic	90	135
Malic	40	90	Pyrocatechol-carboxylic		
Malonic	30	110	acid	105	140
Mesaconic	70	150	Pyrrolidone-carboxylic		
Mucic	0–5	0–5	acid	100	95
Oxalic	20	30	Quinic	85	40
	30	90	β-Resorcylic	160	155
	80	130	Salicylic	235	160
Sebacic	130	160	4-Aminosalicylic	130	145
Succinic	50	125	Shikimic	75	65
Tartaric	30	35–50	Hydrochloric	135	25
Acetylsalicylic	225	160	Nitric	160	35
Anthranilic	145	150	Orthophosphoric	15	30
Benzoic	200	160	Sulphuric	20	5

TABLE XXXVII

R_F VALUES OF LIPIDS

(M. CORMIER AND P. JOUAN, *Bull. soc. chim. biol.*, 39 (1957) 1321)

Paper: Whatman No. 1 impregnated with silicic acid

	Solvents	
	Ether 2 *Petrol ether 100*	*Ether 4* *Petrol ether 50* *Heptane 50*
Oleic acid	0	0
Stearic acid	0	0
Monobutyrine	0.03	0.03
Monopalmitine	0.03	0.03
Dipalmitine	0.05	0.05
Tripalmitine	0.32	0.30
Trioleine	0.32	0.30
Trilaurine	0.32	0.30
Steroids	0.80	0.67
Cholesterol palmitate	0.80	0.67
Cholesterol	0.10	0.08

TABLE XXXVIII

R_F VALUES OF URANIUM FISSION PRODUCTS

(C. E. CROUTHAMEL AND A. J. FUDGE, *J. Inorg. & Nuclear Chem.*, 5 (1958) 240)

Nuclide	*20 g 49% HF per 100 ml methyl ethyl ketone*	*60 g 49% HF per 100 ml methyl ethyl ketone*	*49% HF*
^{137}Cs, ^{134}Cs	0.3	0.6	1.0
^{140}Ba	0.0	0.0	0.8
^{90}Sr	0.0	0.0	0.8
^{141}Ce, ^{140}La	0.0	0.0	0.0
^{95}Nb, ^{97}Nb	1.0	1.0	0.7
^{181}Ta	1.0	1.0	0.7
^{95}Zr, ^{97}Zr	0.0	0.05	0.2
$^{125}Sb(V)$	1.0	1.0	0.8
^{106}Ru	*	(0.2)	(0.8)
$^{132}Te(VI)$	0.5	0.6	0.8
^{99}Mo	0.1	0.25	0.7
^{99m}Tc	0.5	0.6	0.7
^{233}Pa	0.0	0.05	0.9
UO_2^{++}	0.0	0.05	0.8**
^{239}Np	0.0	0.0	0.2**
^{239}Pu	0.0	0.0	0.2**
^{241}Am	0.0	0.0	0.0

* Variable R_F values
** Tailing

TABLE XXXIX*

RELATIVE RETENTION VOLUMES OF ALIPHATIC HYDROCARBONS

(D. W. GRANT AND G. A. VAUGHAN, in D. H. DESTY, *Vapour Phase Chromatography*, Butterworths Scientific Publications, London, 1957, p. 415)

(Temperature = 100°)

Stationary phase	*n-Hexane*	*n-Heptane*	*n-Octane*	*n-Decane*
Liquid paraffin	0.673	1.36	2.91	12.73
Silicone fluid M.S. 550	0.462	0.800	1.56	6.07
Dinonyl phthalate	0.369	0.811	1.61	6.84
Tricresyl phosphate	0.246	0.443	0.820	3.28

TABLE XL

RELATIVE RETENTION VOLUMES OF LOWER HYDROCARBONS ON CARBITOL AND DIMETHYLFORMAMIDE

(M. M. WIRTH, in D. H. DESTY, *Vapour Phase Chromatography*, Butterworths Scientific Publications, London, 1957, p. 162)

(*n*-Pentane = 1, Temperature = 0°)

Hydrocarbon	*B.p. °C*	*Carbitol*	*Dimethyl-formamide*
Propane	— 42.1	0.082	
Propylene	47.7	0.119	
Isobutane	11.7	0.190	0.208
n-Butane	0.5	0.298	0.374
Isobutene	6.9	0.393	0.662
Butene-1	6.3	0.393	0.662
trans-Butene-2	+ 0.9	0.512	0.805
cis-Butene-2	+ 3.7	0.625	1.0
Butadiene	— 4.4	0.738	1.78
Isopentane	+ 27.9	0.738	0.662
3-Methylbutene-1	20.1	0.815	1.15
n-Pentane	36.1	1.0	1.0
Pentene-1	30.0	1.28	1.78
2-Methylbutene-1	31.1	1.46	2.19
2,2-Dimethylbutane	49.7	1.50	1.39
trans-Pentene-2	36.4	1.61	2.19
cis-Pentene-2	37.1	1.76	2.42
2-Methylbutene-2	38.5	1.93	2.88
Cyclopentane	49.3	2.65	2.16
Isoprene	34.1	2.65	5.55
Cyclopentene	44.2	3.11	5.02
trans-Piperylene	42.3	3.51	7.69
cis-Piperylene	44.2	4.02	8.73
Cyclopentadiene	41.0	4.66	11.52

* Tables XXXIX to LV have been collected by A. T. JAMES.

TABLE XLI

RELATIVE RETENTION VOLUMES OF ISOMERIC HEXANES AND HEXENES

(L. J. SULLIVAN, J. R. LOTZ AND C. B. WILLINGHAM, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 495)

(Temperature = 20°; values relative to that of *n*-pentane = 1)

Substance	*Di-n-decyl phthalate*	*Ditetrahydrofurfuryl phthalate*
3,3-Dimethyl-1-butene	1.20	1.30
4-Methyl-1-pentene	2.05	2.15
3-Methyl-1-pentene	2.10	2.15
2,3-Dimethyl-1-butene	2.40	2.55
4-Methyl-*cis*-2-pentene	2.25	2.35
4-Methyl-*trans*-2-pentene	2.40	2.50
2-Methyl-1-pentene	3.10	3.20
1-Hexene	3.20	3.20
2-Ethyl-1-butene	3.60	3.80
cis-3-Hexene	3.50	3.75
trans-3-Hexene	3.50	3.55
2-Methyl-2-pentene	3.85	4.00
3-Methyl-*trans*-2-pentene	4.00	4.25
trans-2-Hexene	3.70	3.65
cis-2-Hexene	4.10	4.20
3-Methyl-*cis*-2-pentene	4.55	4.65
2,3-Dimethyl-2-butene	5.40	5.75
2,2-Dimethylbutane	1.45	1.15
2,3-Dimethylbutane	2.10	1.65
2-Methylpentane	2.15	1.65
3-Methylpentane	2.60	2.30
n-Hexane	3.10	2.20

TABLE XLII

RELATIVE RETENTION VOLUMES OF AROMATIC HYDROCARBONS

(D. W. GRANT AND G. A. VAUGHAN, in D. H. DESTY, *Vapour Phase Chromatography*, Butterworths Scientific Publications, London, 1957, p. 415)

(Temperature = 100°)

Stationary phase	*Benzene*	*Toluene*	*Ethylbenzene*	*m-Xylene*	*o-Xylene*
Liquid paraffin	1	1.99	4.54	5.17	6.08
Silicone fluid M.S. 550	1	2.00	3.92	3.92	4.85
Dinonyl phthalate	1	2.23	4.36	4.86	5.90
Tricresyl phosphate	1	2.05	4.08	4.27	5.32

TABLE XLIII

RELATIVE RETENTION VOLUMES OF HYDROCARBONS

(V. T. BROOKS AND G. A. COLLINS, *Chem. and Ind. (London)*, (1956) 921)

(Temperature 120°, values relative to that of benzene—benzene taken as 1)

Compound	*B.p., °C 760 mm*	*Column liquid phase*					
		"Nujol"	*D.N.P.*	*T.X.P.*	*CW.1000*	*P.P.G.2025*	*M.P.E.G.550*
n-Hexane	69.0	0.66	0.50	0.31	0.47	0.40	0.27
n-Heptane	98.4	1.26	0.80	0.53	0.52	0.66	0.36
n-Octane	125.6	2.42	1.46	0.93	0.61	1.13	0.52
n-Decane	174.0	9.43	5.00	3.12	1.00	3.48	1.23
Cyclohexane	80.7	1.11	0.72	0.55	0.63	0.65	0.42
Methylcyclohexane	100.4	1.75	1.00	0.78	1.00	0.89	0.51
1-Hexene	64.1	0.64	0.48	0.36	0.48	0.42	0.27
1-Heptene	94.9	1.19	0.81	0.59	0.57	0.70	0.39
1-Octene	121.6	2.34	1.44	1.00	0.71	1.20	0.60
1-Nonene	145.3	4.57	2.58	1.87	0.91	2.10	1.00
1-Decene	172.0	9.06	4.83	3.43	1.31	3.76	1.62
Cyclohexene	83.2	1.21	0.91	0.73	0.70	0.83	0.58
4-Methylcyclohexene	102.6	1.87	1.30	1.00	0.78	1.12	0.71
Benzene	80.1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Toluene	110.6	2.06	1.91	1.87	1.31	1.76	1.56
Ethylbenzene	136.2	3.84	3.30	3.29	1.84	2.99	2.44
p-Xylene	138.4	4.37	3.81	3.43	2.04	3.17	2.62
m-Xylene	139.2	4.51	3.76	3.64	2.03	3.35	2.64
o-Xylene	144.5	4.93	4.26	4.31	2.40	3.86	3.25
Cumene	152.4	5.63	5.07	4.53	2.40	4.17	3.23
n-Propylbenzene	159.2	7.55	5.97	5.77	2.72	5.24	3.74
Mesitylene	164.6	8.73	6.88	6.48	3.02	5.97	4.33
Pseudocumene	169.2	11.20	8.00	7.84	3.60	7.02	5.39
sec.-Butylbenzene	171.0	11.31	8.45	7.89	3.30	7.05	4.62
p-Cymene	175.0	13.45	9.90	8.44	3.60	7.45	5.39
tert.-Amylbenzene	191.0	20.60	14.42	13.18	4.85	11.57	7.25
Hydrindene	178.0	12.60	10.05	10.78	5.50	9.84	8.00
Styrene	145.2	4.98	4.60	4.89	3.39	4.76	4.52
a-Methylstyrene	161.5	9.18	7.75	8.11	4.72	7.45	6.38
Indene	182.0	14.65	13.73	15.25	10.15	12.50	14.10

Nujol = Liquid paraffin (Stemco Ltd.); D.N.P. = Dinonyl phthalate (British Industrial Solvents); T.X.P. = Trixylenyl phosphate (Albright & Wilson Ltd.); CW.1000 = Polyethylene glycol 1000 (Gemec Chemicals Co.); P.P.G.2025 = Polypropylene glycol 2025 (Gemec Chemicals Co.); M.P.E.G.550 = Methoxy polyethylene glycol 550 (Gemec Chemicals Co.).

TABLE XLIV

RELATIVE RETENTION VOLUMES OF HYDROCARBONS AND SULFUR COMPOUNDS

(D. H. DESTY AND B. H. F. WHYMAN, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 330)

(Operating temperature, 78.5°; *n*-pentane = 1)

No.	Boiling pt., °C 760 mm	Compound	Stationary phase: *n*-Hexatriacontane r.r.v.	*n*-Hexatriacontane $\log_{10}$ r.r.v.	Benzyldiphenyl r.r.v.	Benzyldiphenyl $\log_{10}$ r.r.v.
		Paraffins				
1	— 11.73	Isobutane	0.29	— 0.538	—	—
2	— 0.50	*n*-Butane	0.39	— 0.409	—	—
3	+ 9.50	Neopentane	0.44	— 0.356	—	—
4	27.85	Isopentane	0.77	— 0.113	0.76	— 0.119
5	36.07	*n*-Pentane	1.00	0	1.00	0
6	49.74	2,2-Dimethylbutane	1.34	+ 0.127	1.26	+ 0.100
7	57.99	2,3-Dimethylbutane	1.83	0.263	1.74	0.241
8	60.27	2-Methylpentane	1.83	0.263	1.79	0.253
9	63.28	3-Methylpentane	2.12	0.326	2.05	0.312
10	68.74	*n*-Hexane	2.42	0.384	2.31	0.364
11	79.20	2,2-Dimethylpentane	3.00	0.477	2.57	0.410
12	80.50	2,4-Dimethylpentane	3.08	0.489	2.63	0.420
13	80.88	2,2,3-Trimethylbutane	3.49	0.543	2.94	0.468
14	86.06	3,3-Dimethylpentane	4.13	0.616	3.84	0.584
15	89.78	2,3-Dimethylpentane	4.55	0.658	4.03	0.605
16	90.05	2-Methylhexane	4.27	0.630	3.74	0.573
17	91.85	3-Methylhexane	4.68	0.670	4.14	0.617
18	93.48	3-Ethylpentane	5.18	0.714	4.63	0.666
19	98.43	*n*-Heptane	5.73	0.758	5.26	0.721
20	99.24	2,2,4-Trimethylpentane	5.28	0.723	4.26	0.629
21	106.84	2,2-Dimethylhexane	6.57	0.818	5.49	0.740
22	109.10	2,5-Dimethylhexane	7.13	0.853	5.94	0.774
23	109.43	2,4-Dimethylhexane	7.45	0.872	6.23	0.795
24	109.84	2,2,3-Trimethylpentane	8.10	0.909	6.89	0.838
25	111.97	3,3-Dimethylhexane	8.49	0.929	7.17	0.856
26	113.47	2,3,4-Trimethylpentane	9.21	0.964	8.03	0.905
27	114.76	2,3,3-Trimethylpentane	10.00	1.000	8.71	0.940
28	115.61	2,3-Dimethylhexane	9.63	0.984	8.51	0.930
29	115.65	2-Methyl-3-ethylpentane	9.84	0.993	8.83	0.946
30	117.65	2-Methylheptane	9.83	0.993	8.54	0.932
31	117.71	4-Methylheptane	10.12	1.005	8.83	0.946
32	117.73	3,4-Dimethylhexane	10.73	1.030	9.67	0.985
33	118.26	3-Methyl-3-ethylpentane	11.33	1.054	10.09	1.004
34	118.53	3-Ethylhexane	10.69	1.029	9.66	0.985
35	118.93	3-Methylheptane	10.58	1.025	8.54	0.932
36	125.67	*n*-Octane	13.42	1.128	12.00	1.079
37	150.80	*n*-Nonane	30.96	1.491	27.14	1.434
38	174.12	*n*-Decane	—	—	61.20	1.787
		Aromatics				
39	80.10	Benzene	4.19	0.622	10.77	1.032
40	110.63	Toluene	10.50	1.021	25.46	1.406
41	136.19	Ethylbenzene	21.97	1.342	53.97	1.732
42	138.35	*p*-Xylene	26.02	1.416	57.78	1.762
43	139.10	*m*-Xylene	25.72	1.410	55.63	1.745
44	144.41	*o*-Xylene	30.72	1.487	73.19	1.864
		Cyclopentanes				
45	49.26	Cyclopentane	1.90	0.279	2.54	0.405
46	71.81	Methylcyclopentane	3.25	0.512	3.74	0.573
47	87.85	1,1-Dimethylcyclopentane	4.77	0.679	5.00	0.699
48	90.77	*cis*-1,3-Dimethylcyclopentane	5.18	0.714	5.66	0.753

(Contd. on p. xxix)

TABLE XLIV (*Continued*)

No.	Boiling pt., °C 760 mm	Compound	Stationary phase: n-Hexatriacontane r.r.v.	n-Hexatriacontane log_{10} r.r.v.	Benzyldiphenyl r.r.v.	Benzyldiphenyl log_{10} r.r.v.
		Cyclopentanes (contd.)				
49	91.87	*trans*-1,2-Dimethylcyclopentane	5.49	0.740	5.71	0.757
50	99.53	*cis*-1,2-Dimethylcyclopentane	7.25	0.860	8.03	0.905
51	103.47	Ethylcyclopentane	8.18	0.913	9.31	0.969
52	105.05	1,1,3-Trimethylcyclopentane	10.39	1.017	10.43	1.018
53	109.40	1,2,4-Trimethylcyclopentane (low boiling isomer)	8.53	0.931	8.03	0.903
54	116.95	1,2,4-Trimethylcyclopentane (high boiling isomer)	11.37	1.056	11.32	1.054
55	121.50	1-Methyl-1-ethylcyclopentane	13.61	1.134	14.93	1.174
56	126.95	Isopropylcyclopentane	16.20	1.210	17.14	1.234
57	130.95	*n*-Propylcyclopentane	18.43	1.266	20.49	1.312
		Cyclohexanes				
58	80.74	Cyclohexane	4.50	0.653	5.54	0.744
59	100.94	Methylcyclohexane	7.77	0.890	8.46	0.927
60	119.54	1,1-Dimethylcyclohexane	13.05	1.115	13.46	1.129
61	120.10	*cis*-1,3-Dimethylcyclohexane	12.95	1.112	12.80	1.107
62	131.78	Ethylcyclohexane	19.61	1.293	21.46	1.331
		Other Saturated Cyclics				
63	118.9	Cycloheptane	14.00	1.146	18.09	1.257
64	151	Cyclo-octane	38.72	1.588	51.43	1.711
65	108	Norbornylane	9.45	0.975	13.55	1.132
66	132	*trans*-(3,3,0)-Bicyclo-octane	24.53	1.389	38.13	1.581
67	135	*cis*-(3,3,0)-Bicyclo-octane	24.39	1.387	36.41	1.561
		Olefins				
		Alkenes				
68	31.16	2-Methyl-1-butene	0.91	— 0.041	1.25	0.097
69	38.57	2-Methyl-2-butene	1.16	+ 0.065	1.55	0.190
70	56.30	*cis*-4-Methyl-2-pentene	1.68	0.225	2.06	0.314
71	58.55	*trans*-4-Methyl-2-pentene	1.73	0.238	1.97	0.295
72	63.49	1-Hexene	2.13	0.328	2.73	0.426
73	72.5	4,4-Dimethyl-1-pentene	2.59	0.413	2.61	0.417
74	101.44	2,4,4-Trimethyl-1-pentene	6.09	0.785	6.23	0.795
75	104.91	2,4,4-Trimethyl-2-pentene	6.34	0.802	7.33	0.865
76	121.28	1-Octene	11.70	1.068	13.40	1.127
		Cyclic Olefins				
77	82.98	Cyclohexene	5.03	0.702	7.83	0.894
78	115	Cycloheptene	12.41	1.094	19.12	1.281
		Cyclic Diolefins				
79	41	Cyclopentadiene	1.32	0.121	3.17	0.501
80	70	Methylcyclopentadiene	3.20	0.505	7.09	0.851
81	81	Cyclohexadiene	4.27	0.630	10.02	1.009
		Sulfur Compounds				
		Alkane Sulfides				
82	37.28	2-Thiapropane	1.14	0.057	3.38	0.529
83	92.06	3-Thiapentane	5.22	0.718	13.81	1.140
84	118.50	3-Thiahexane	11.67	1.087	29.13	1.464
		Cyclic Sulfides				
85	121.45	Thiacyclopentane	13.33	1.125	50.59	1.704
86	133.23	2-Methylthiacyclopentane	18.85	1.275	61.19	1.787
		Thiophenes				
87	84.10	Thiophene	4.58	0.661	15.06	1.178
88	115.44	3-Methylthiophene	10.04	1.001	35.28	1.548

TABLE XLV

VALUES AND PARTITION COEFFICIENTS FOR COMPOUNDS ON PEG 400, METHOXY PEG 350, AND PPG 425*

(E. R. ADLARD, in D. H. DESTY, *Vapour Phase Chromatography*, Butterworths Scientific Publications, London, 1957, p. 105)

Substance	*V_g° at 200 mm Hg and 100°*			*Partition coefficient at 100° (Stationary phase / N_2)*		
	PEG 400	*Methoxy PEG 350*	*PPG 425*	*PEG 400*	*Methoxy PEG 350*	*PPG 425*
n-Pentane	3.56	5.73	9.24	2.98	5.58	8.95
n-Hexane	5.87	10.24	19.85	5.36	10.4	19.0
n-Heptane	10.23	18.47	40.60	9.85	19.1	38.6
n-Octane	17.38	34.07	80.22	17.1	35.6	76.0
n-Decane	48.71	110.6	—	49.3	117	—
Benzene	50.13	73.47	80.34	52.1	77.3	76.1
Toluene	85.94	132.6	159.4	89.7	140	151
m-Xylene	146.6	239.9	313.0	153	254	296
o-Xylene	188.9	303.2	382.4	198	321	362
Mesitylene	249.1	428.4	606.6	261	453	573
Methanol	52.62	55.50	49.81	54.6	58.3	47.2
Ethanol	62.89	70.99	65.28	65.5	73.7	61.8
n-Propanol	109.4	133.4	130.7	114	141	124
n-Butanol	199.4	256.7	270.7	209	271	256
n-Pentanol	362.3	495.3	554.2	380	524	524
Acetone	18.61	38.38	34.09	18.9	39.9	32.4
MEK	35.85	64.05	63.80	37.0	67.3	60.4
MIPK	44.19	80.32	89.33	45.8	83.6	84.6
DEK	59.42	102.6	113.8	61.8	108	108
MIBK	72.28	127.3	151.4	75.4	134	143
Ethyl acetate	38.39	53.30	60.37	39.7	55.9	57.1
n-Propyl acetate	63.54	94.28	115.9	66.2	99.3	110
n-Butyl acetate	108.6	173.8	227.7	113	184	215
Water	170.4	153.7	99.31	—	—	—

* V_g° = retention volume per g of stationary phase corrected to zero pressure drop across the column; PEG = polyethylene glycol; PPG = polypropylene glycol.

TABLE XLVI

UNCORRECTED RETENTION VOLUMES OF CHLORO-, BROMO- AND SOME OTHER COMPOUNDS
(G. F. HARRISON, in D. H. DESTY, *Vapour Phase Chromatography*, Butterworths Scientific Publications, London, 1957, p. 336)

Column		*Paraffin*		*Silicone fluid MS 710*		*DNP*		*TCP*	
Compound	*B.p. °C*	*35°*	*77°*	*35°*	*77°*	*35°*	*77°*	*35°*	*77°*
Ethyl chloride	12.2	72	—	100	—	156	—	130	—
2-Chloropropene	22	—	—	132	32	192	44	130	30
Isopropyl chloride	35.5	160	48	188	44	276	76	192	44
1,1-Dichloroethylene	37	212	56	212	52	325	84	216	60
Dichloromethane	40.1	196	56	332	80	595	136	530	125
Allyl chloride	44.6	212	56	292	76	450	116	370	84
n-Propyl chloride	47.2	268	72	308	76	450	116	330	84
trans-1,2-Dichloroethylene	48.4	356	96	372	84	590	136	460	110
tert.-Butyl chloride	51.5	268	72	264	64	408	100	260	64
1,1-Dichloroethane	57.3	356	96	500	112	840	188	685	150
cis-1,2-Dichloroethylene	60.1	452	124	685	148	1320	270	1180	250
Chloroform	61	580	144	775	164	1620	320	1520	290
Propargyl chloride	65	224	60	470	108	—	—	—	—
sec.-Butyl chloride	68	544	144	560	124	870	210	590	136
Isobutyl chloride	68.9	—	—	—	156	—	220	—	159
1,1,1-Trichloroethane	74.1	780	204	840	176	1290	270	950	200
Carbon tetrachloride	76.5	960	248	940	196	1180	270	980	205
n-Butyl chloride	78	780	204	865	180	1380	280	880	190
1,2-Dichloroethane	83.5	712	180	1200	250	1780	410	2100	410
tert.-Amyl chloride	86	—	—	880	184	1500	300	920	195
Trichloroethylene	87	—	352	—	290	—	510	—	390
Isoamyl chloride	98.9	—	372	—	290	—	520	—	335
1,1,2-Trichloroethane	113.5	—	580	—	680	—	1350	—	1350
Tetrachloroethylene	121.2	—	220*	—	—	—	—	—	—
1,1 1,2-Tetrachloroethane	130.5	—	—	—	1140	—	—	—	—
1,1,2,2-Tetrachloroethane	146.3	—	460*	—	2200*	—	—	—	520*
Ethyl ether	34.6	156	44	160	35	220	55	135	35
Ethyl bromide	38	208	50	265	60	360	88	280	70
Acetone	56.5	108	32	245	60	390	90	440	100
Methyl alcohol	64.7	—	—	70	—	230	—	—	—
n-Hexane	69	600	—	—	—	440	—	—	—
Ethyl alcohol	78.9	192	50	160	30	510	88	690	125
Toluene	110	—	670	—	—	—	—	—	—
1,2-Dibromoethane	131	—	—	—	980	—	1620	—	—

* At 136°.

TABLE XLVII

CORRECTED RETENTION VOLUMES OF CHLORO COMPOUNDS

(F. H. POLLARD AND C. J. HARDY, in D. H. DESTY, *Vapour Phase Chromatography*, Butterworths Scientific Publications, London, 1957, p. 117)

Liquid phase	*Weight g*	*Temp. °C*	*Corrected retention volume per gramme* V_g°			
			CH_3Cl	CH_2Cl_2	$CHCl_3$	CCl_4
Kieselguhr	3.00	27.3	—	1.5/3 g	2.25/3 g	2.3/4g
Dibutyl phthalate	4.0	57.0	—	108	254	182
Dinonyl phthalate	1.89	57.2	27.3 (24.5°)	82.8	210	173
Silicone 702	2.14	56.7	10.0	60.5	136	180
Silicone 702	2.14	20.2	25.1	232	595	746
Silicone 1107	1.98	19.5	—	149	390	565
Glycerol	2.27	24.4	2.16	12.9	16.75	3.85
Liquid paraffin	1.85	56.6	—	33.8	87.6	170
Water	1.72	24.2	—	14.7	5.95	1.70

TABLE XLVIII

CORRECTED RETENTION VOLUMES OF CHLORO AND FLUORO COMPOUNDS

(F. H. POLLARD AND C. J. HARDY, in D. H. DESTY, *Vapour Phase Chromatography*, Butterworths Scientific Publications, London, 1957, p. 117)

	Column	*4.0 g Dibutyl phthalate*	*1.89 g Dinonyl phthalate*	*2.14 g Silicone 702*	*1.83 g Charcoal 207B*
Temperature		*20°*	*24.5°*	*40.1°*	*137°*
Boiling point	*Compound*	*Corrected retention volume per gramme* V_g°			
— 82.2	CF_3H	2.5	1.8	0.45	7.6
— 80	CF_3Cl	0.6	0.6	0.54	17.3
— 40.8	CF_2ClH	21.6	17.3	5.57	53.0
— 28	CF_2Cl_2	8.3	9.5	6.10	152
8.9	$CFCl_2H$	88.0	131.5	41.0	453
24.1	$CFCl_3$	171	80.5	47.0	1160
— 23.7	CH_3Cl	—	27.3	22.0	57.5

TABLE XLIX

RELATIVE RETENTION VOLUMES OF THE METHYLAMINES

(A. T. JAMES, A. J. P. MARTIN AND G. HOWARD SMITH, *Biochem. J.*, 51 (1952) 323)

(Volumes are relative to that of NH_3, taken as 1)

Liquid phase (% v/v)	*CH_3NH_2*	*$(CH_3)_3N$*	*$(CH_3)_2NH$*	*Temp. (°C)*
Hendecanol	3.4	4.2	5.2	78.6
Hendecanol–15% liquid paraffin	3.6	4.6	5.8	78.6
Hendecanol–50% liquid paraffin	4.2	7.5	7.5	65
Liquid paraffin–33% hendecanol	3.8	6.8	6.8	65
Liquid paraffin	1.65	2.7	2.7	78.6
Glycerol	2.5	0.47	approx. 1	100
Silicone DC550–10% hendecanol	1.33	0.36	0.78	65

TABLE L

RETENTION VOLUMES OF AMINES RELATIVE TO THAT OF ETHYLAMINE WITH NON-POLAR AND POLAR LIQUID PHASES IN THE COLUMNS AT 100°

(A. T. JAMES, *Biochem. J.*, 52 (1952) 242)

Amine	*B.p. °C)*	*Column liquid phase*	
		Paraffin	*Lubrol MO*
Methylamine	— 6.5	0.61	0.68
Dimethylamine	7.4	0.93	0.81
Ethylamine	16.6	1	1
Trimethylamine	3.5	1.17	0.67
Isopropylamine	34	1.49	1.42
n-Propylamine	48.7	2.20	2.10
Diethylamine	55.5	3.25	2.10
sec.-Butylamine	63	3.57	2.8
Isobutylamine	68	3.70	3.1
Ethylenediamine	118	4.65	15.5
n-Butylamine	77.8	4.7	4.4
Ethanolamine	172.2	5.25	25.8
Diisopropylamine	83	6.8	3.00
Triethylamine	89.5	8.6	3.1
Isoamylamine	95	8.8	7.3
n-Amylamine	104	10.5	9.7
Di-*n*-propylamine	110.7	13.2	7.2
4-Methylpentyl-1-amine	123.9	17.8	13.8
n-Hexylamine	132.7	22.6	19.6
Di-*sec.*-butylamine	132.0	27.6	9.74
Cyclohexylamine	134	28.4	25.9
Diisobutylamine	139	30.4	10.9
n-Heptylamine	158.3	49.5	40.05
Tri-*n*-propylamine	156	49.6	15.1
Di-*n*-butylamine	159	62.1	27.6
Tri-*n*-butylamine	214	—	85.5
Benzylamine	185	81.0	91.5

TABLE LI

RETENTION VOLUMES OF SOME AROMATIC BASES RELATIVE TO ANILINE AT 137° IN 3 TYPES OF COLUMN

(A. T. JAMES, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1564)

N atom	*Substituents in position*					*Paraffin wax*	*Lubrol MO*	*Benzyl-diphenyl*
	2	*3*	*4*	*5*	*6*			
—	F–	—	—	—	—	0.72	—	0.63
—	F–	—	F–	—	—	0.74	0.75	—
—	F–	—	—	F–	—	0.79	1.08	—
—	—	—	F–	—	—	0.96	1.28	1.1
—	—	F–	—	—	—	—	0.99	1.52
—	—	F–	CH_3–	—	—	1.88	2.28	—
—	—	—	CH_3–	—	—	1.95	1.63	1.75
—	CH_3–	—	F–	—	—	2.0	2.28	—
—	—	CH_3–	—	—	—	2.0	1.56	1.86
CH_3–	—	—	—	—	—	2.05	1.28	1.73
—	CH_3–	—	—	—	—	2.05	1.53	1.8
$(CH_3)_2$	CH_3–	—	—	—	—	2.56	0.71	1.07
$(CH_3)_2$	—	—	—	—	—	2.60	1.05	1.68
—	Cl–	—	—	—	—	2.8	2.34	2.6
C_2H_5–	—	—	—	—	—	3.18	1.66	2.33
—	CH_3O–	—	—	—	—	3.4	2.7	3.7
CH_3–	CH_3–	—	—	—	—	3.4	—	3.05
CH_3–	—	CH_3–	—	—	—	3.4	—	3.28
—	—	—	Cl–	—	—	3.7	5.25	4.4
CH_3 | C_2H_5	—	—	—	—	—	3.76	—	—
—	—	Cl–	—	—	—	3.8	5.35	4.4
—	CH_3–	—	CH_3–	—	—	3.84	2.60	3.36
—	NH_2–	—	—	—	—	3.92	7.95	6.6
—	CH_3–	—	—	CH_3–	—	4.0	2.7	3.14
—	—	—	CH_3O–	—	—	4.1	5.5	—
—	—	NH_2–	—	—	—	4.2	—	10.0
—	CH_3–	—	—	—	CH_3–	4.25	2.5	3.22
—	—	CH_3–	CH_3–	—	—	4.27	3.27	3.8
CH_3	Cl–	—	—	—	—	4.3	—	3.7
—	—	CH_3O–	—	—	—	4.4	5.8	6.6
—	CH_3–	CH_3–	—	—	—	4.6	3.34	4.0
$(CH_3)_2$	Cl–	—	—	—	—	4.8	—	—
—	Br–	—	—	—	—	4.9	4.5	5.0
—	—	—	CH_3O–	—	—	4.9	—	5.7
$(CH_3)_2$	—	—	CH_3–	—	—	5.1	1.7	2.74
C_2H_5	CH_3–	—	—	—	—	5.21	2.34	3.66
$(CH_3)_2$	—	CH_3–	—	—	—	5.4	1.8	2.9
$(C_2H_5)_2$	—	—	—	—	—	5.45	1.9	3.0
n-C_3H_7–	—	—	—	—	—	5.82	2.7	4.0
C_2H_5–	—	CH_3–	—	—	—	5.9	3.02	4.4
C_2H_5–	—	—	CH_3–	—	—	6.0	2.9	4.4
—	—	NH_2–	—	—	—	6.2	—	12.4
—	—	—	C_2H_5O–	—	—	6.2	—	8.8
—	—	—	Br–	—	—	6.4	10.0	8.8
—	—	Br–	—	—	—	6.4	10.0	9.0
CH_3–	—	—	Cl–	—	—	7.35	—	6.9
—	—	Br–	CH_3–	—	—	8.8	—	—
—	NO_2–	—	—	—	—	9.8	—	—
—	Cl–	Cl–	—	—	—	10.0	—	—
—	Cl–	—	Cl–	—	—	10.0	—	—
—	I–	—	—	—	—	10.1	—	—
$(C_2H_5)_2$	—	—	CH_3–	—	—	10.5	3.2	5.0

(Contd. on p. xxxv)

V.1
1958

TABLE LI (*Continued*)

N atom	*Substituents in position*					*Paraffin wax*	*Lubrol MO*	*Benzyl-diphenyl*
	2	*3*	*4*	*5*	*6*			
$(C_2H_5)_2$	—	CH_3–	—	—	—	10.8	3.1	5.1
n-C_4H_9–	—	—	—	—	—	11.0	4.7	7.0
—	—	—	I–	—	—	13.0	—	23.2
—	—	I–	—	—	—	13.1	22.4	23.2
—	CH_3O–	—	—	CH_3O–	—	14.0	—	—
—	—	Cl–	Cl–	—	—	14.6	—	—
—	CH_3O–	—	—	NH_2–	—	16.4	—	—
iso-C_5H_{11}–	—	—	—	—	—	16.8	6.4	—
$(CH_3)_2$	—	—	Br–	—	—	17.3	6.8	13.3

TABLE LII

RELATIVE RETENTION VOLUMES OF PYRIDINE HOMOLOGUES

(A. T. JAMES, *Biochem. J.*, 52 (1952) 242)

(Temperature, 137°; values relative to that of pyridine, taken as 1)

Column liquid phase	*α-Picoline*	*β-Picoline*	*γ-Picoline*	*2,6-Lutidine*	*2,4-Lutidine*	*2,4,5-Collidine*
DC550	1.39	2.3	2.24	1.94	2.82	4.30
Lubrol MO	1.50	2.3	2.34	2.15	3.40	4.85
Liquid paraffin	1.75	2.4	2.31	2.80	4.00	6.35

DC550 = Dow Corning Silicone or MS. 550, Midland Silicones Ltd.; Lubrol MO = polymer of ethylene oxide and a long chain alcohol.

TABLE LIII

RELATIVE RETENTION VOLUMES OF PYRIDINE HOMOLOGUES

(V. T. BROOKS AND G. A. COLLINS, *Chem. and Ind. (London)*, (1956) 1021)

Compound	*B.p.(°C)*	*Stationary phase*					
		Nujol 120°	*T.X.P.* 120°	*C.W. 1000* 120°	*S.M.430* 140°	*T.E.A.* 120°	*G.* 90°
Pyridine	115.26	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
α-Picoline	129.41	1.80	1.72	1.22	1.60	1.13	0.82
2,6-Lutidine	144.05	2.90	2.64	1.43	2.31	1.16	0.53
β-Picoline	144.14	2.55	3.12	1.98	2.10	1.90	1.54
γ-Picoline	145.36	2.55	3.12	2.07	2.10	2.20	1.86
2-Ethylpyridine	148.70	3.25	3.24	1.74	2.72	1.25	0.62
2,5-Lutidine	157.01	4.34	4.40	2.25	3.06	2.22	1.22
2,4-Lutidine	157.90	4.42	4.47	2.43	3.06	2.55	1.55
2,3-Lutidine	160.8	4.95	4.85	2.79	3.45	2.68	1.51
2-Methyl-6-ethylpyridine	160.1	5.00	4.40	1.83	3.84	1.17	0.30
3-Ethylpyridine	165.0	5.25	5.73	2.99	3.84	3.00	1.65
4-Ethylpyridine	167.7	5.20	6.25	3.60	3.84	3.53	2.11
2,4,6-Collidine	170.3	6.95	6.20	2.83	4.27	2.34	1.00
3,5-Lutidine	172.2	6.10	6.85	3.68	4.07	3.60	2.30
2,3,5-Collidine	186.8	11.17	11.08	4.74	6.29	4.87	2.46
2,3,4-Collidine	192.7	13.75	13.15	6.80	7.33	7.98	4.03

Nujol = Liquid paraffin (Stemco Ltd.); T.X.P. = Trixylenyl phosphate (Albright and Wilson Ltd.);C.W. 1000 = Polyethylene glycol 1000 (Gemec Chemicals Co.); S.M.430 = Silicone M.430 (I.C.I. Ltd.); T.E.A. = Triethanolamine (B.D.H. Ltd.); G. = Glycerol (B.D.H. Ltd.).

TABLE LIV

RETENTION VOLUMES OF FREE FATTY ACIDS RELATIVE TO THAT OF *n*-BUTYRIC ACID ON SILICONE–STEARIC ACID COLUMNS

(A. T. JAMES AND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 50 (1952) 679)

Acid	*B.p. (°C)*	*Column temp.*	
		100°	*137°*
Formic	107.7	0.076	—
Acetic	118.1	0.20	0.26
Propionic	141.1	0.47	0.54
Isobutyric	154.4	0.77	0.81
n-Butyric	163.5	1.0	1.0
a,*a*-Dimethylpropionic	163.8	1.15	—
Isovaleric	176.7	1.51	1.48
a-Methylbutyric	177	1.70	—
n-Valeric	187	2.17	1.91
γ-Methylvaleric	199.1	—	2.94
Hexanoic	205	—	3.58
Heptanoic	223.5	—	6.55
Octanoic	237.5	—	12.0
Nonanoic	254	—	22.0
Decanoic	268–70	—	40.5
Hendecanoic	225*	—	72.8
Dodecanoic	225**	—	138.5

* 100 mm Hg.
** 40 mm Hg.

TABLE LV

RETENTION VOLUMES OF METHYL ESTERS OF SATURATED FATTY ACIDS FROM FORMIC TO *n*-CAPROIC ACID RELATIVE TO METHYL *n*-BUTYRATE IN A VARIETY OF STATIONARY PHASES AT TWO TEMPERATURES

(A. T. JAMES AND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 63 (1956) 144)

Methyl ester	*Temp. 78.6° Stationary phase*		*Temp. 100° Stationary phase*		
	Liquid paraffin	*Dioctyl phthalate*	*Paraffin wax*	*Benzyldiphenyl*	*Dioctyl phthalate*
Formate	0.071	0.098	0.09	0.117	0.124
Acetate	0.177	0.216	0.228	0.261	0.256
Propionate	0.445	0.485	0.495	0.53	0.51
Isobutyrate	0.724	0.71	0.75	0.67	0.706
n-Butyrate	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
a,*a*-Dimethylpropionate	1.04	0.87	1.0	—	0.875
a-Methylbutyrate	1.69	1.51	1.52	—	1.45
Isovalerate	1.63	1.56	1.53	1.34	1.45
n-Valerate	2.42	2.31	2.15	2.13	2.12
3-Methylvalerate	4.25	3.66	3.53	—	—
Isocaproate	4.5	3.96	3.60	3.03	3.24
n-Caproate	5.86	5.16	4.70	4.37	4.36

TABLE LVI*

RETENTION VOLUMES OF METHYL ESTERS OF LONGER CHAIN SATURATED FATTY ACIDS RELATIVE TO METHYL MYRISTATE IN TWO STATIONARY PHASES AT 197°

(A. T. JAMES AND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 63 (1956) 144)

Ester	*Stationary phase*	
	'Apiezon M' vacuum grease	*Heavy lubricating oil extract*
Methyl *n*-pentanoate (valerate)	0.0194	0.0148
Methyl *n*-hexanoate (caproate)	0.0311	0.240
Methyl 4-methylhexanoate	0.0407	0.0354
Methyl 6-methylheptanoate	0.0567	0.052
Methyl *n*-octanoate (caprylate)	0.0715	0.064
Methyl 6-methyloctanoate	0.0965	0.0861
Methyl *n*-nonanoate (pelargonate)	0.112	0.100
Methyl 8-methylnonanoate	0.144	0.133
Methyl *n*-decanoate (caprate)	0.173	0.169
Methyl 8-methyldecanoate	0.235	0.229
Methyl 10-methylundecanoate	0.354	0.344
Methyl *n*-dodecanoate (laurate)	0.426	0.396
Methyl 10-methyldodecanoate	0.567	0.55
Methyl *n*-tetradecanoate (myristate)	1.0	1.0
Methyl 12-methyltetradecanoate	1.35	1.37
Methyl 14-methylpentadecanoate	2.04	2.09
Methyl *n*-hexadecanoate (palmitate)	2.41	2.45
Methyl 14-methylhexadecanoate	3.24	3.32
Methyl *n*-octadecanoate (stearate)	5.60	5.92

TABLE LVII

RETENTION VOLUMES OF METHYL ESTERS OF SOME UNSATURATED ACIDS RELATIVE TO METHYL *n*-TETRADECANOATE IN TWO STATIONARY PHASES AT 197°

(A. T. JAMES AND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 63 (1956) 144)

Ester	*Stationary phase*	
	'Apiezon M' vacuum grease	*Heavy lubricating oil extract*
Methyl *cis*-palmitoleate	2.09	2.21
Methyl *trans*-palmitoleate	2.16	2.26
Methyl linoleate	4.55	5.05
Methyl oleate	4.75	5.22
Methyl petroselinate	4.87	5.15
Methyl elaidate	4.95	5.40
Methyl *cis*-$\Delta^{4,5}$-octadecenoate	4.95	5.42
Methyl *trans*-$\Delta^{4,5}$-octadecenoate	5.15	5.52

* Tables LVI and LVII have been collected by A. T. JAMES.

TABLE LVIII*

R_{Lys} VALUES OF SOME N-METHYL-LYSINE DERIVATIVES
(K. PODUŠKA, *Chem. listy*, 52 (1958) 153)

Paper: Whatman No. 1.
Solvents: (a) phenol, water, ammonia system
(b) *n*-butanol, acetic acid, water (6:1:3, upper phase).
Time of run: 14 days.

Compound	*(a)*	*(b)*
N^{ε}-Dimethyl-DL-lysine	1.12	1.45
N^{ε}-Methyl-DL-lysine	1.10	1.41
N^{α}-Dimethyl-DL-lysine	1.13	1.48
N^{α}-Methyl-DL-lysine	1.08	1.33

TABLE LIX

R_F VALUES OF SOME LYSERGIC ACID DERIVATIVES
(K. MACEK AND S. VANĚČEK, *Chem. listy*, 52 (1958) 553)

Paper: Whatman No. 1.
Temperature: 20° (approx.). Special conditions: carried out in the dark.
Solvents: (a) formamide, chloroform
(b) benzene, methanol, water (2:1:1)
(with the latter solvent the paper sheets were hung in the chromatography cabinet for 10–15 hours and allowed to equilibrate with an atmosphere produced by 50% aqueous methanol).
Location: ultraviolet light.

Compound	*(a)*		*(b)*
	R_F	R_{ME}§	R_F
d-Lysergic acid	0.00	0.01	0.00
l-Lysergic acid	0.00	0.01	0.00
d-Isolysergic acid	0.02	0.20	0.01
l-Isolysergic acid	0.02	0.20	0.01
(+)-Propanolamide-(2) of *d*-lysergic acid	0.07	0.45	0.04
(+)-Propanolamide-(2) of *l*-lysergic acid	0.06	0.41	0.03
(+)-Propanolamide-(2) of *d*-isolysergic acid	0.33	—	0.24
(+)-Propanolamide-(2) of *l*-isolysergic acid	0.50	—	0.36
(+)-Butanolamide-(2) of *d*-lysergic acid	0.12	1.00	0.08
(+)-Butanolamide-(2) of *l*-lysergic acid	0.10	0.79	0.06
(+)-Butanolamide-(2) of *d*-isolysergic acid	0.52	—	0.41
(+)-Butanolamide-(2) of *l*-isolysergic acid	0.66	—	0.54
(—)-Butanolamide-(2) of *d*-lysergic acid	0.10	—	0.06
(—)-Butanolamide-(2) of *l*-lysergic acid	0.12	—	0.08
(—)-Butanolamide-(2) of *d*-isolysergic acid	0.66	—	0.54
(—)-Butanolamide-(2) of *l*-isolysergic acid	0.52	—	0.41

§ R_{ME} values are based on the mobility of the (+)-butanolamide-(2) of *d*-lysergic acid (methylergometrine).

* Tables LVIII to LXII have been collected by C. B. COULSON.

TABLE LX

R_F VALUES OF SOME MONOHYDRIC PHENOLS

(J. FRANC, *Chem. listy*, 52 (1958) 55)

Paper: Whatman No. 4 impregnated by dipping in 20% ethanolic solutions of formamide, acetamide or dimethylformamide. Descending chromatography. Dimethylformamide reduces losses of phenol, *p*-cresol and *p*-ethylphenol.
Solvent: Cyclohexane–pyridine in various proportions.
Detection: Pauly reagent.

Substance	*Dipole moment of phenol*	*Formamide*					*Acetamide*			*Dimethylformamide*			*Colour of spots*
		Cyclohexane–pyridine					*Cyclohexane–pyridine*			*Cyclohexane-pyridine*			
		25:0	*25:1*	*25:2*[a]*	*25:4*[a]	*25:10*	*25:1*	*25:5*	*25:10*	*25:1*[a]	*25:5*[b]	*25:10*[c]	
Phenol	1.6	0.12	0.32	0.31	0.35	0.29	0.32	0.33	0.50	0.18	0.12	0.45	Yellow
o-Cresol	1.4	0.30	0.58	0.55	0.61	0.53	0.56	0.52	0.63	0.31	0.22	0.59	Brownish yellow
m-Cresol	1.8	0.19	0.46	0.43	0.48	0.45	0.44	0.41	0.58	0.23	0.16	0.56	Orange
p-Cresol	2.0	0.19	0.44	0.41	0.46	0.43	0.42	0.40	0.58	0.22	0.17	0.51	Violet
2,3-Dimethylphenol	1.8	0.40	0.68	0.64	0.72	0.66	0.67	0.60	0.73	0.32	0.32	0.68	Brown
2,4-Dimethylphenol	1.8	0.40	0.69	0.65	0.72	0.66	0.66	0.60	0.75	0.36	0.31	0.67	Reddish violet
2,5-Dimethylphenol	1.6	0.42	0.69	0.66	0.71	0.67	0.68	0.59	0.70	0.32	0.33	0.69	Brown
3,4-Dimethylphenol	2.2	0.25	0.49	0.51	0.61	0.58	0.51	0.44	0.58	0.21	0.21	0.62	Orange-violet
3,5-Dimethylphenol	2.0	0.30	0.58	0.57	0.61	0.60	0.56	0.51	0.64	0.28	0.26	0.65	Orange-brown
o-Ethylphenol	1.4	0.55	0.76	0.75	0.80	0.74	0.73	0.70	0.80	0.41	0.33	0.71	Orange
m-Ethylphenol	1.8	0.37	0.63	0.64	0.70	0.64	0.62	0.56	0.68	0.31	0.28	0.67	Orange
p-Ethylphenol	2.0	0.35	0.61	0.60	0.67	0.64	0.60	0.56	0.67	0.30	0.26	0.66	Violet
3-Methyl-5-ethylphenol	2.0	0.49	0.74	0.75	0.80	—	0.72	0.66	—	0.33	0.36	0.72	Brown

* Chromatography was carried out at 18° ([a] 19°; [b] 20°; [c] 21°).

TABLE LXI

R_F VALUES OF SOME SULPHAMIDOBENZOIC ACIDS

(M. TROJNA AND J. HUBÁČEK, *Chem. listy*, 52 (1958) 87)

Paper: Whatman No. 4.
Reagent: An 0.06% solution of bromocresol green in 96% ethanol adjusted to pH 7 with a borate–boric acid buffer.
Solvents: (a) *n*-propanol, 5% NH_3 (1:1)
(b) isopropanol, 5% NH_3 (1:1)
(c) *n*-butanol, 5% NH_3 (1:1)
(d) isobutanol, 5% NH_3 (1:1).

Acid	*(a)*	*(b)*	*(c)*	*(d)*
o-Sulphamidobenzoic	—	—	0.28	—
m-Sulphamidobenzoic	0.80	—	0.23	0.18
p-Sulphamidobenzoic	0.75	0.83	0.15	0.12

TABLE LXII

R_F VALUES OF SOME CARDIAC GLYCOSIDES

(J. PITRA, H. KOLÁŘOVÁ AND Z. ČEKAN, *Chem. listy*, 52 (1958) 745)

Solvent: chloroform, dioxan, water (7:2:0.5).
Temperature of run: 20 ± 2°.
Length of run: 40–45 cm (descending).
Paper: Whatman No. 4 or Schleicher & Schüll No. 2043b, impregnated by dipping in a 25% solution of formamide in methanol.
Reagents: trichloroacetic acid with chloramine or a modified Kedde's reagent.

Compound	R_F
Lanatoside A	0.81
Lanatoside B	0.59
Desacetyl-lanatoside A	0.53
Lanatoside C	0.40
Desacetyl-lanatoside B	0.18
Desacetyl-lanatoside C	0.10

See also F. KAISER, *Ber.*, 88 (1955) 556.

TABLE LXIII

R_F VALUES OF HALOGENATED ACETIC AND PROPIONIC ACIDS

(J. W. CHITTUM, T. A. GUSTIN, R. L. MCGUIRE AND J. T. SWEENEY, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1213)

Solvent: Butanol saturated with 1.5 *N* NH_4OH.
Paper: Whatman No. 1.

Acid	R_F *value*	*Acid*	R_F *value*
Acetic	0.08	Propionic	0.08
Monochloroacetic	0.14	2-Chloropropionic	0.23
Dichloroacetic	0.27	3-Chloropropionic	0.19
Trichloroacetic	0.45	2-Bromopropionic	0.25
Monobromoacetic	0.02	3-Bromopropionic	0.20
Dibromoacetic	0.10	2,3-Dibromopropionic	0.27
Tribromoacetic	0.31		

TABLE LXIV

R_F VALUES OF AROMATIC ACIDS

(J. FRANC, *Collection Czechoslov. Chem. Communs.*, 23 (1958) 655)

Acid	R_F *values*	
	Butanol 3 *Ethanol* 1 *Pyridine* 1 *Water* 1	*Butanol* 3 *Pyridine* 1 *Water* 1
Phthalic	0.69	0.75
Isophthalic	0.16	0.15
Terephthalic	0.13	0.11
p-Toluic	0.69	0.75
Benzoic	0.63	0.71
	Butanol 5 *Pyridine* 3 *Water* 3	*Isoamyl alcohol* 1 *Ethanol* 1 *Pyridine* 1 *Water* 1
3-Nitrophthalic	0.26	0.43
4-Nitrophthalic	0.54	0.66
5-Nitroisophthalic	0.54	0.64
2-Nitroterephthalic	0.30	0.48
2,5-Dinitroterephthalic	0.55	0.64
3-Nitro-*p*-toluic 3,5-Dinitrotoluic	0.77	0.81
2,5-Dinitrotoluic	0.71	0.78
m-Nitrobenzoic	0.73	0.79
3,5-Dinitrobenzoic	0.66	0.72
2,6-Dinitrobenzoic	0.18	0.37
2,4-Dinitrobenzoic	0.55	0.64
3,4-Dinitrobenzoic	0.34	0.47
2,4,6-Trinitrobenzoic	0.60	0.69
Monomethyl 2-nitroterephthalate	0.72	
Monomethyl 5-nitroterephthalate	0.65	
Dimethyl 2-nitroterephthalate	0.94	
2-Nitro-*p*-toluic	0.95	

TABLE LXV

R_F VALUES OF HYDROQUINONE DERIVATIVES

(M. BARBIER AND E. LEDERER, *Biokhimiya*, 22 (1957) 236)

Solvent: Benzene–acetic acid–water (8:2:1).
Conditions: Descending, Whatman No. 1 paper.
Detection: Spraying with 10% aqueous Na_2CO_3.

Substance	R_F
2,3-Dimethyl-hydroquinone	0
Hydroxy-hydroquinone	0.01
Hydroquinone	0.07
Methyl-hydroquinone	0.10
2-Methoxy-hydroquinone	0.25
Ethyl-hydroquinone	0.30
2-Ethoxy-hydroquinone	0.55
Propyl-hydroquinone	0.65

TABLE LXVI

R_F VALUES OF NAPHTHOQUINONE PIGMENTS OF SEA URCHINS

(M. BARBIER AND E. LEDERER, unpublished results)

Solvent: Butanol–1% aqueous formic acid.
Paper: Whatman No. 1.
Method: Ascending.

*Pigment**	R_F
Echinochrome	0.79
Spinochrome A	0.08
Spinochrome B	0.75
Spinochrome C	0.08
Spinochrome E	0

* For nomenclature see *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 92.

TABLE LXVII

R_F VALUES OF N-SUBSTITUTED PHENOTHIAZINES

(R. L. TABAU AND J. P. VIGNE, *Bull. soc. chim. France*, (1958) 458)

Solvent: Acetone 10, *M* ammonium acetate 20, *M* acetic acid 5; allowed to stand 6 days before use.
Conditions: Whatman No. 1 paper, ascending method at 20°.

Substance	R_F
Phenothiazine	0
Methylene blue (for reference)	0.25
Thiazinamium	0.88
Chlorpromazine	0.80
Acepromazine	0.89
Isothazine	0.91
Methopropazine	0.87
Promethazine	0.83
Diethazine	0.85

CHROMATOGRAPHIC DATA VOL. 1 (1958)

AUTHOR INDEX

ABRAHAM, M. H., A. G. DAVIES, D. R. LLEWELLYN AND E. M. THAIN . xx
ADLARD, E. R. xxx
BANISTER, A. J., see POLLARD, F. H.
BARBIER, M. AND E. LEDERER xlii
BERGMANN, E. D. AND T. GRUENWALD . . . . . xiv, xv
BROOKS, V. T. AND G. A. COLLINS xxvii, xxxv
CARLES, J., A. SCHNEIDER AND A. M. LACOSTE xxiii
ČEKAN, Z., see PITRA, J.
CHITTUM, J. W., T. A. GUSTIN, R. L. MCGUIRE AND J. T. SWEENEY . xli
COLLINS, G. A., see BROOKS, V. T.
CORMIER, M. AND P. JOUAN xxiv
CROUTHAMEL, C. E. AND A. J. FUDGE xxiv
DAVIES, A. G., see ABRAHAM, M. H.
DESTY, D. H. AND B. H. F. WHYMAN . xxviii
FONDERAI, J., see VIGNE, J. P.
FRANC, J. . . . . vii, xxxix, xli
FUDGE, A. J., see CROUTHAMEL, C. E.
FUNASAKA, W. AND T. KOJIMA. . . . xix
GASPARIČ, J. AND M. VEČEŘA xviii
——, see VEČEŘA, M.
GÖTTE, H. AND D. PÄTZE xiii
GRANT, D. W. AND G. A. VAUGHAN xxv, xxvi
GRUENWALD, T., see BERGMANN, E. D.
GUEDES DE CARVALHO, R. A. xii
GUSTIN, T. A., see CHITTUM, J. W.
HANOT, C. xxi
HARDY, C. J., see POLLARD, F. H.
HARRISON, G. F. xxxi
HARTKAMP, H. AND H. SPECKER . . . xii
HEADRIDGE, J. B., see MAGEE, R. J.
HINMAN, R. L. vi
HOLNESS, H. AND W. R. STONE . . . xix
HUBÁČEK, J., see TROJNA, M.
JAMES, A. T. . . . . xxxiii, xxxiv, xxxv
—— AND A. J. P. MARTIN . . xxxvi, xxxvii
——, A J. P. MARTIN AND G. H. SMITH xxxiii
JOUAN, P., see CORMIER, M.
KERTES, S. ii
KIMURA, M., see MORI, I.
KOJIMA, T., see FUNASAKA, W.
KOLÁŘOVÁ, H., see PITRA, J.
KRACHT, W., see WIELAND, TH.
KRAUS, K. A. AND F. NELSON x
LACOSTE, A. M., see CARLES, J.
LATINAK, J. ix
LEDERER, E., see BARBIER, M.
LEDERER, M. xvi
LISSITZKY, S. AND M. ROQUES xx
LLEWELLYN, D. R., see ABRAHAM, M. H.
LOTZ, J. R., see SULLIVAN, L. J.
MACEK, K. AND S. VANĚČEK xxxviii
MCGUIRE, R. L., see CHITTUM, J. W.
MAGEE, R. J. AND J. B. HEADRIDGE . ix
MALÝ, E. xxii
MARTIN, A. J. P., see JAMES, A. T.
MICHEEL, F. AND W. SCHMINKE . . . xiv
MORI, I. AND M. KIMURA viii
NELSON, F., see KRAUS, K. A.
NETTO, I. xxii
PÄTZE, D., see GÖTTE, H.
PETRÁNEK, J., see VEČEŘA, M.
PITRA, J., H. KOLÁŘOVÁ AND Z. ČEKAN xl
PODUŠKA, K. xxxviii
POLLARD, F. H. AND A. J. BANISTER . vi
—— AND C. J. HARDY xxxii
REES, W. R. AND T. REYNOLDS . . . xxii
REYNOLDS, T., see REES, W. R.
ROQUES, M., see LISSITZKY, S.
SCHMINKE, W., see MICHEEL, F.
SCHNEIDER, A., see CARLES, J.
SMITH, G. H., see JAMES, A. T.
SPECKER, H., see HARTKAMP, H.
STONE, W. R., see HOLNESS, H.
STRUCK, H. xxi
SULLIVAN, L. J., J. R. LOTZ AND C. B. WILLINGHAM xxvi
SUNDT, E. AND M. WINTER xiv
SWEENEY, J. T., see CHITTUM, J. W.
TABAU, R. L. AND J. P. VIGNE xlii
THAIN, E. M., see ABRAHAM, M. H.
THEANDER, O. xvii
TROJNA, M. AND J. HUBÁČEK xl
VANĚČEK, S., see MACEK, K.
VAUGHAN, G. H., see GRANT, D. W.
VEČEŘA, M., J. PETRÁNEK AND J. GASPARIČ xxi
——, see GASPARIČ, J.
VIGNE, J. P. AND J. FONDERAI . . . vii
——, see TABAU, R. L.
WHYMAN, B. H. F., see DESTY, D. H.
WIELAND, TH. AND W. KRACHT . . . iv
WILLINGHAM, C. B., see SULLIVAN, L. J.
WINSAUER, K. xvi
WINTER, M., see SUNDT, E.
WIRTH, M. M. xxv
ZIJP, J. W. H. v

CHROMATOGRAPHIC DATA VOL. 1 (1958)

SUBJECT INDEX

Alignment chart to calculate ΔR_M directly from R_{F_1} and R_{F_2} iii
Conversion of R_F to R_M values ii
Electromigration data
Acids, inorganic xvi
Aldehydes xvii
Amines, aromatic xxi
Food colours viii
Ketones xvii
Ion exchange data
Dowex-1 with HCl x
Retention volumes
Acetates xxx
Acids, fatty xxxvi
Alcohols xxx
Amines xxxiii
Bases, aromatic xxxiv
Bromo compounds xxxi
Chloro compounds . . . . . xxxi, xxxii
Fluoro compounds xxxii
Hexanes xxvi
Hexenes xxvi
Hydrocarbons . . . . . xxvii, xxviii
——, aliphatic . . . . . xxv, xxx
——, aromatic . . . . . xxvi, xxx
——, lower xxv
Ketones xxx
Methylamines xxxiii
Methyl esters of saturated fatty acids . . . . . xxxvi, xxxvii
—— —— of unsaturated acids . xxxvii
Pyridine homologues xxxv
Sulphur compounds xxviii
R_F values, etc.
Acids, aromatic xli
——, halogenated aliphatic . . . xli
——, organic xxiii
Alkali metals ix
Anthracenes xv
Cardiac glycosides xl
R_F values, etc. *(continued)*
"Chrysene fraction" of aromatic tar xiv
Dinitroanthraquinones vii
Dinitrobenzoates of aliphatic alcohols xiv
Dinitronaphthalenes vii
Dinitrophenylhydrazones of aldehydes and ketones xviii
Dinitrotoluenes vii
Fission product elements and groups . . . . . xiii, xxiv
Fluorenes xv
Food colours xxii
Guanidine derivatives v
Hydantoin derivatives vii
Hydrazine derivatives vi
Hydrazo compounds, aromatic . . xxi
Hydrocarbons, aromatic iv
——, polycyclic xxii
Hydroquinone derivatives xlii
Hydroxylamine derivatives . . . vi
Hydroxystearic acids xvi
Inorganic ions xii
Lipids xxiv
Lysergic acid derivatives xxxviii
Mercapto compounds v
Methyl-lysine derivatives xxxviii
Naphtholsulphonic acids ix
Naphthoquinone pigments of sea urchins xlii
Oestrogens xxi
Peroxides, organic xx
Phenols . . . . . xviii, xxxix
Phenothiazine derivatives xlii
Pyridine homologues xix
Pyridinium chlorides xix
Quaternary ammonium chlorides . xix
Sugars xxii
Sulphamidobenzoic acids xl
Thyronine oxidation products . . xx
Uranium fission products xxiv

5895-38-9